Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Evaluación de la actividad sinérgica entre quitosano de pluma de pota (*Dosidicus gigas*) y ácido cítrico en el pardeamiento enzimático de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)

TESIS
Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTORES
Freddy Jhonathan QUISPE RUEDA
Yanina Katty VILLA ENCARNACION

ASESOR
Mg. Sc. Noemí BRAVO ARANÍBAR

Lima, Perú

2021

Referencia bibliográfica

Quispe, F & Villa, Y. (2021). *Evaluación de la actividad sinérgica entre quitosano de pluma de pota (Dosidicus gigas) y ácido cítrico en el pardeamiento enzimático de la pulpa de chirimoya (Annona cherimola Mill.)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

<table>
<tr><td>Código ORCID del autor</td><td>—</td></tr>
<tr><td>DNI o pasaporte del autor</td><td>Freddy Jhonathan Quispe Rueda
72604461
Yanina Katty Villa Encarnacion
47528327</td></tr>
<tr><td>Código ORCID del asesor</td><td>https://orcid.org/0000-0003-3454-2601</td></tr>
<tr><td>DNI o pasaporte del asesor</td><td>10672520</td></tr>
<tr><td>Grupo de investigación</td><td>—</td></tr>
<tr><td>Agencia financiadora</td><td>—</td></tr>
<tr><td>Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación</td><td><table><tr><th>LUGAR</th><th>COORDENADA GEOGRÁFICA</th></tr><tr><td>Facultad de Química e Ingeniería Química - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Cercado de Lima)</td><td>Latitud: -12.060149

Longitud: -77.083259</td></tr></table></td></tr>
<tr><td>Año o rango de años en que se realizó la investigación</td><td>2018 - 2019</td></tr>
<tr><td>Disciplinas OCDE</td><td>Alimentos y bebidas
https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.01

Otras ingenierías y tecnologías
https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.02

Ingeniería de producción
https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.03

Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria
https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01</td></tr>
</table>

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del **Q.F. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS**, el **Ing. CARLOS ALBERTO SUCA APAZA** (Miembro) y la **Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR** (Asesora), habiendo presentado para el efecto la **TESIS,** titulada "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SINÉRGICA ENTRE QUITOSANO DE PLUMA DE POTA (*Dosidicus gigas*) Y ÁCIDO CÍTRICO EN EL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PULPA DE CHIRIMOYA (*Annona cherimola Mill.*)",** después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborado por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **QUISPE RUEDA FREDDY JHONATHAN***;* para optar el **TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL,** acordando calificarlo con la **NOTA** de:
:

DIECINUEVE **19**

……..……..……..……..……..…

(LETRAS) (NÚMEROS)

Lima, 20 de enero del 2021

Q.F. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS
Presidente

Ing. CARLOS ALBERTO SUCA APAZA
Membro

Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR
Asesora

UNMSM
Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 01.02.2021 09:53:04 -05:00

Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del **Q.F. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS**, el **Ing. CARLOS ALBERTO SUCA APAZA** (Miembro) y la **Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR** (Asesora), habiendo presentado para el efecto la **TESIS,** titulada "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SINÉRGICA ENTRE QUITOSANO DE PLUMA DE POTA (*Dosidicus gigas*) Y ÁCIDO CÍTRICO EN EL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO DE LA PULPA DE CHIRIMOYA (*Annona cherimola Mill.*)",** después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **VILLA ENCARNACION YANINA KATTY***;* para optar el **TITULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL,** acordando calificarla con la **NOTA** de:

DIECINUEVE **19**

……..……..……..……..……..…

(LETRAS) (NÚMEROS)

Lima, 20 de enero del 2021

Q.F. OSCAR PEDRO SANTISTEBAN ROJAS
Presidente

Ing. CARLOS ALBERTO SUCA APAZA
Membro

Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR
Asesora

UNMSM

Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 01 02.2021 09:54:00 -05:00

Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial

DEDICATORIA

Quiero comenzar ante todo agradeciendo a Dios, por brindarme fortaleza, fe y a una familia increíble que me apoyó incondicionalmente desde el comienzo hasta el final del proyecto de investigación.

Dedico esta tesis a mi madre, Estela por todo su amor, paciencia, esfuerzo y todas sus enseñanzas, a ser un chico responsable, perseverante, independiente, ahorrador. Por el gran apoyo económico que me brindaba durante el periódo de la investigación ya sea en pasajes, almuerzo u otro material de laboratorio que requería, esta tesis lo hice pensando en ti mamá. ¡Gracias por todo!

A mi padre, Raúl por todo su apoyo emocional y por su esfuerzos todas las mañana para prepararme mi desayuno. Gracias papá, facilitaste mucho el poder culminar este proyecto. Junto a mamá me dieron la motivación para seguir adelante.

A mis hermanos, Alex, Lisbeth y Diego por ser un gran soporte emocional y antiestrés en los momentos críticos o tensos del trabajo de investigación. Siempre pude contar con ustedes para un momento pequeño de relajo, ya sea jugando o simplemente molestandoles. A estos momentos de distracción se le suma mi primo Martín y Gabriel. Gracias por esos cortos, pero buenos momentos de risas al finalizar el día.

Con el mismo cariño quiero culminar estas palabras dedicando este trabajo de investigación a la mejor compañera de trabajo que he podido encontrar en el camino, a alguien que me ayuda desinteresadamente a mejorar cada día en el ámbito personal y profesional, a alguien que potencializa mis ideas y ganas de trabajar, a alguien que con su nobleza y bondad no la dejo de admirar, a alguien que se complementa muy bien conmigo, de tal forma que se podría hablar de un sinergismo, tal cual como el objetivo de esta tesis. Gracias por ayudarme tanto, fue un placer y toda una dicha de realizar esta investigación junto a ti, y que este trabajo no sea el último que realizaremos con mucha dedicación. ¡Muchas gracias por todo Yanina!, te quiero como no tienes idea.

"Freddy"

Quiero agradecer a Dios por brindar vida, salud y fortaleza a mi familia, quienes con su fe y palabras de aliento me impulsaron a comenzar y concluir este proyecto de investigación.

Esta tesis está dedicada a mi madre Josefina, quien es mi motor para cada día mejorar como profesional, pero sobre todo como persona. Agradezco tu compañía, tus palabras de aliento, tus preocupaciones por aquellas incontables llamadas para saber si ya estaba rumbo a casa, pues se me hacía tarde en el laboratorio, esperarme con la cena caliente para comer juntas. Admiro tu fuerza, entereza y fragilidad, eres mi mayor ejemplo. Te amo mamá.

A mi padre Heber, quien es el motor para crecer como profesional y persona. Admiro y agradezco tu sacrificio y arduo trabajo que realizas para poder sacarnos adelante como familia. Siempre apoyándome con poco o mucho, pero que yo aprecio enormemente, pues soy consciente de todo el esfuerzo que lleva detrás. Te prometo que sacaré adelante las chacras que con tanto amor y dedicación cuidas ahora. Te amo papá.

A mi abuela Santiaga Segura, gracias por la compañía que me hacías al momento de redactar mi tesis, por los momentos de distracciones al cocinar bailando. Cada sonrisa tuya, debido a mis ocurrencias, me impulsaron a seguir con este proyecto. Espero tenerte aún mucho tiempo a mi lado y darte aquellos abrazos prolongados. Te quiero mucho mamita.

A mi tía abuela Claudia Salguerano, quién a pesar de no estar cerca, siempre está al pendiente de mi y su familia. Gracias por tus incontables rezos pidiendo a Dios que me guarde con su infinita misericordia e ilumine en cada paso nuevo que doy. Los consejos que me das se convierten en enseñanzas que me ayudan a seguir mejorando. Te quiero mucho tía.

A mis hermanos Dionicia, Vanessa, Guiler y Jossy quienes entre consejos, bromas y risas me ayudaron a hacer más amena los días de estrés propios de esta aventura llamada tesis. No podía dejar de agradecer y mencionar a mis cuñados Danty y Juan por su incondicional apoyo, además de los chukis de mis sobrinos Patrick, Nazly y Liam por distraerme con sus ocurrencias y juegos. Los quiero a todos.

Por último, pero por ello no menos importante, agradecer a mi amigo y compañero de tesis, Freddy, quién me acompañó de principio a fin, y juntos batallamos para que nuestros sueños y pensamientos sean ahora una realidad, nuestra tesis. Gracias por todos tus consejos, por las llamadas de atención, por tu paciencia, por las peleas, por cubrirme cuando tenía mis clases y no podía estar en el laboratorio, y sobre todo por cada una de tus ocurrencias. Fueron días de estrés, tristeza, alegría y carcajadas, momentos muy bonitos compartidos junto a una de las mejores personas que he conocido. En el trayecto aprendimos mucho de varias personitas que la vida puso frente a nosotros y sin dudarlo nos dieron su apoyo haciendo posible esta tesis. Te deseo lo mejor en el ámbito personal y profesional, aprendí y sigo aprendiendo mucho de ti, admiro tu perseverancia para ser mejor cada día, llegarás muy lejos, de eso estoy segura. Fue toda una aventura, nunca pensamos cuantas anécdotas podríamos tener, pero lo conseguimos. ¡Gracias por todo! Te quiero mucho Rick.

"Yanina"

AGRADECIMIENTOS

A nuestra alma mater, la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** "Decana de América", por el prestigio y la calidad de enseñanza, en especial a nuestra querida **E.P. de Ingeniería Agroindustrial,** perteneciente a la Facultad de Química e Ingeniería Química, por ser el lugar donde recibimos los conocimientos necesarios para formarnos como profesionales.

A nuestra asesora **Mg. Sc. Noemi Bravo Aranibar**, quien nos acompañó durante todo el desarrollo de la tesis hasta la sustentación de la misma, formando parte de este proyecto de investigación. Gracias por la confianza, apoyo, comprensión, exigencia y disposición, haciendo posible la culminación del presente trabajo. Ambos agradecemos las palabras de motivación y consejos que nos impulsaron a seguir mejorando desarrollando en nosotros el interés y la importancia que tiene la investigación. Retribuyendo la confianza depositada mediante disciplina y responsabilidad. Estamos muy agradecidos y felices que haya aceptado desde un inicio ser nuestra asesora de tesis.

Al **Dr. Olivio Nino Castro Mandujano,** quien junto con nuestra asesora, fueron los primeros en apoyarnos desinteresadamente, apostando por nosotros en el desarrollo de un proyecto de investigación. Queremos agradecerle todo el apoyo brindado, consejos, materiales, reactivos y recomendaciones durante los errores experimentales, esto nos motivó a seguir adelante facilitando la culminación del presente trabajo, el cual se realizó con mucha responsabilidad en forma de retribución a la confianza proporcionada desde un inicio.

Al **Dr. Julio Cesar Santiago Contreras**, responsable del laboratorio de Investigación y Desarrollo, quien cortésmente accedió a que utilicemos sus instalaciones para materializar el procedimiento experimental de esta tesis. Otorgandonos su confianza, aquella que decidimos devolver mediante responsabilidad, compromiso y disciplina. Muchas gracias por darnos la oportunidad de desarrollar cada evaluación que sirvió para obtener los resultados necesarios del proyecto. Además, nos es grato haber formado parte de la historia del laboratorio y ser partícipes de momentos especiales, nuevamente, muchas gracias.

A la **Química Marlene Velásquez Yucra**, quien muy amablemente nos acogió, desde el primer día que ingresamos al laboratorio de Investigación y Desarrollo, recibiendo su apoyo, orientación y disposición. Gracias por ser de las personas que confiaron en nosotros, por la paciencia al enseñarnos el correcto uso de los equipos, por los buenos momentos compartidos, por la llegada de Hanna, quien terminó siendo Hans, por el cariño recibido, y por las pláticas y risas que hicieron del laboratorio un lugar cómodo y tranquilo para trabajar. Gracias por toda su ayuda.

Al **Químico Marco Vicente Guerrero Aquino,** responsable del laboratorio de Síntesis Orgánica quien amablemente aceptó poder realizar en su instalación los primeros ensayos preliminares del presente trabajo de investigación. Agradecemos su confianza y disponibilidad para prestarnos el laboratorio y los instrumentos necesarios, lo cual

permitieron llevar a cabo las primeras formulaciones del proyecto. Muchas gracias por todos los consejos, recomendaciones, historias contadas y bromas. Le agradecemos de todo corazón, sus alumnos "Los Hannos".

A los profesores e investigadores **Jose Francisco Román Ferreyra** y **José Manuel Churata Chávez,** por las recomendaciones durante las evaluaciones fisicoquímicas (sólidos solubles totales y acidez titulable) en las pruebas preliminares, siendo de gran ayuda para la obtención de resultados correctos. Además agradecemos todas sus ocurrencias, diálogos y debates científicos durante sus ensayos en el laboratorio, convirtiendo el lugar de trabajo, un ambiente agradable con ganas de seguir en el rubro de la investigación.

Al **Ing. Carlos Suca Apaza,** que a su vez, en su cargo como revisor designado de nuestro plan de tesis, nos supo guiar y dar consejos mediante sus observaciones logrando un mayor nivel investigativo. Además por las orientaciones brindadas en la parte estadística del proyecto.

Al **Químico Farmacéutico Oscar Pedro Santisteban Rojas**, designado como presidente de jurado, quien nos brindó su tiempo y dedicación para apoyarnos con cada recomendación dada, mejorando el presente trabajo de investigación. Gracias, profesor, por sus enseñanzas durante nuestra formación universitaria, forjando en nosotros, sus alumnos, responsabilidad, compromiso, empeño y superación.

A **nuestros amigos**, por la preocupación, interés y ánimo brindado hacia nosotros durante el desarrollo de esta tesis, en especial, a nuestra amiga y futura ingeniera **Pressilla Leslie Inga Blas**, por su amabilidad, disponibilidad y apoyo desinteresado, al punto de llegar tarde a su casa, con tal de ayudarnos en parte del proceso experimental de la tesis.

A la **Familia Quispe Rueda**, por el tiempo brindado y su gentil apoyo al contribuir en parte del proceso experimental de la tesis, además de aquellas palabras de ánimo que fueron nuestro soporte y motivación para encontrar la solución ante los obstáculos presentados durante ese proceso.

A la **Familia Villa Encarnación,** por facilitarnos el cultivo y transporte de las chirimoyas producidas en su chacra (Cañal) durante toda la evaluación preliminar y parte del análisis experimental del proyecto. Siendo de un gran apoyo económico en el transcurso de la investigación.

A la **Familia Pomacaja Zárate**, quienes amablemente nos abrieron las puertas de su hogar, obteniendo un espacio confortable donde corregir algunos de los ensayos preliminares. Además de permitirnos usar los utensilios, instrumentos (balanza) y equipos (licuadora, refrigeradora) necesarios para ensayos en el pulpeo de la chirimoya.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo estudiar el efecto sinérgico producido entre el quitosano y ácido cítrico en el control del pardeamiento enzimático en la pulpa de chirimoya, fruto procedente del anexo La Merced de Chaute, distrito de San Bartolomé, provincia de Huarochirí, región Lima, ubicada a 2491 msnm.

El estudio se realizó en tres etapas; la primera consistió en extraer y caracterizar al quitosano, para ello se recolectaron los residuos hidrobiológicos provenientes del calamar gigante (pluma de pota) en el terminal pesquero de Ventanilla (Lima). La extracción y obtención del biopolímero se logró mediante la desacetilación alcalina utilizando altas concentraciones de NaOH. La caracterización de quitosano presentó 10,52% de humedad, 0,35% de cenizas, 602 mL/g de viscosidad intrínseca, 78,2% del grado de desacetilación y 846 kDa de peso molecular.

En la segunda etapa se buscó seleccionar la variedad de chirimoya apropiada para su comercialización y posterior estudio en base a los parámetros fisicoquímicos y de rendimiento industrial. Se evaluaron 4 frutas para cada variedad de estudio (Lisa, Impresa y Umbonata). La variedad Lisa presentó las mejores condiciones para su procesado e industrialización, registrando un alto rendimiento en pulpa (70,07%) y bajo rendimiento en pepa (3,10%) y cáscara (26,31%); respecto a los índices físicoquímicos se obtuvo un valor adecuado de sólidos solubles totales (19,80 °Brix), acidez titulable (0,30% mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra) y *p*H (4,56), registrando el menor contenido significativo ($p < 0,05$) de polifenoles totales (218,03 mg ácido gálico/100 g muestra fresca), siendo este último parámetro relevante al seleccionar la variedad adecuada, debido a su alta interdependencia con el desarrollo del pardeamiento enzimático.

En la tercera etapa se estudió el posible efecto sinergista producido entre el quitosano y ácido cítrico, estableciendo los siguientes tratamientos de estudio: T_1 = control, T_2 = AC 3%, T_3 = CS 0,75% y T_4 = CS 0,75% + AC 3%, evaluando los cambios fisicoquímicos producidos en la pulpa de chirimoya durante 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 días de almacenamiento. La pulpa tratada con formulación T_4 (CS 0,75% + AC 3%) presentó menor actividad de la polifenoloxidasa promedio (70,80 unidades de PPO/min x g de muestra) y una lenta oxidación de los compuestos polifenólicos (28 mg de ácido gálico/100g en peso de pulpa fresca) durante la evaluación. La variación del color, producto del pardeamiento enzimático en la chirimoya, siguió el modelo de una reacción química de orden cero (lineal). Empleando la ecuación de Arrhenius y la variación de color como indicador de calidad, se pronosticó la vida útil de la pulpa, donde T_4 estima el mayor tiempo de vida (254 días) a comparación del T_2 (158 días), T_3 (125 días) y T_1 (100 días), evidenciando así un efecto sinérgico que contribuye a retrasar el pardeamiento enzimático.

Palabras clave: *quitosano, pulpa, color, actividad sinérgica, pardeamiento enzimático.*

ABSTRACT

This research work aimed to study the synergistic effect produced between chitosan and citric acid in the control of enzymatic browning in cherimoya pulp, fruit from the annex La Merced de Chaute, district of San Bartolomé, province of Huarochirí, region Lima, located at 2491 m.s.n.m.

The project was developed in three stages; The first stage consisted of extracting and characterizing the chitosan, for which the hydrobiological residues from the giant squid (squid plume) were collected at the Ventanilla fishing terminal (Lima). The extraction and obtaining of the biopolymer was achieved by alkaline deacetylation using high concentrations of NaOH. Chitosan characterization presented 10,52% moisture, 0,35% ash, 602 mL/g intrinsic viscosity, 78,2% deacetylation degree and a molecular weight of 846 kDa.

In the second stage, we sought to select the appropriate custard apple variety for its commercialization and subsequent study based on the physicochemical and industrial performance parameters. Four fruits were evaluated for each study variety (Lisa, Impresa and Umbonata). The Lisa variety presented the best conditions for it is processing and industrialization, registering a high yield in pulp (70,07%) and low yield in seed (3,10%) and peel (26,31%); with respect to the physicochemical indices An adequate value of total soluble solids (19,80 °Brix), titratable acidity (0,30% mEq-g of citric acid/100 g of sample) and *p*H (4,56) were obtained, registering the lowest significant content ($p < 0,05$) of total polyphenols (218,03 mg gallic acid/100g sample), this last parameter being relevant when selecting the appropriate variety, due to its high interdependence with the development of enzymatic browning.

In the third stage, the possible synergistic effect produced between chitosan and citric acid was studied, establishing the following study treatments: T_1 = control, T_2 = AC 3%, T_3 = CS 0,75% y T_4 = CS 0,75% + AC 3%, evaluating the physicochemical changes produced in the custard apple pulp during 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 days of storage. The pulp treated with formulation T_4 (CS 0,75% + AC 3%) presented lower activity of the average polyphenoloxidase (70,80 PPO units/min x g of sample) and a slow oxidation of the polyphenolic compounds (28 mg of acid gallic/100 g pulp) during evaluation. The color variation, product of the enzymatic browning in the custard apple, followed the model of a zero-order (linear) chemical reaction. Using the Arrhenius equation and color variation as a quality indicator, the pulp shelf life was predicted, where T_4 estimates the longest shelf life (254 days) compared to T_2 (158 days), T_3 (125 days) and T_1 (100 days), thus evidencing a synergistic effect that contributes to delaying enzymatic browning.

Keywords: *chitosan, pulp, color, synergistic activity, enzymatic browning.*

1. INTRODUCCIÓN

En una entrevista realizada a Alfonso Velásquez Tuesta, ex presidente ejecutivo de Sierra Exportadora, organismo adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), indicó que los productos de la sierra y amazonía del Perú, tienen gran potencial para darles valor agregado y ser destinados a mercados externos, pero hace falta mayores oportunidades e industrialización (Diario Gestión, 2015). Esto nos indica que en el interior de nuestro país, existe una deficiencia de avance tecnológico, ejemplo de ello es que actualmente, los pobladores del anexo La Merced de Chaute en la provincia de Huarochirí, presentan una falta de conocimiento en actividades poscosecha e industrialización de la chirimoya, desaprovechando los beneficios que se obtendrían a partir de un adecuado manejo y/o transformación en productos de mayor valor agregado. Además, no se evidencia industrias que procesen esta materia prima en lugares cercanos a la zona, ocasionando que la demanda del fruto no incremente y persista el problema socioeconómico que aqueja a la población.

La chirimoya cultivada en el Perú posee una alta aceptación en el mercado nacional e internacional gracias a sus propiedades sensoriales, aunque ciertos factor limitan la producción y posterior comercialización, por esta razón se considera un recurso para el subsistir del productor a causa del bajo acceso a tecnología adecuada (Kobashigawa, 2018).

El sector alimentario busca evitar la oxidación de los alimentos, en algunas frutas frescas y hortalizas cuando son peladas o cortadas, utilizando diferentes técnicas, que van desde el envasado hermético al vacío hasta el uso de sustancias con propiedades antioxidantes (Ibáñez, Torre e Irigoyen, 2003; Suárez, 2009). En la chirimoya, el control del pardeamiento enzimático de la polifenoloxidasa, se realiza por inhibición química (Mariano, 2003). La polifenoloxidasa, PPO, es sumamente estudiada en la industria alimentaria, dado que es la causante de las reacciones de pardeamiento enzimático indeseables en frutas y hortalizas, ya que modifica los atributos sensoriales (color, sabor, textura y olor), nutricionales y de calidad, perjudicando el comercio del producto (Guerrero, 2009). El principal problema de la pulpa de chirimoya es el pardeamiento u oxidación, que en la familia *Annona* solo se puede evitar con productos químicos, pues utilizar altas temperaturas provoca el desarrollo de sabores extraños (Kobashigawa, 2018).

Por otro lado, el uso del quitosano ha tomado mayor importancia por tratarse de un producto natural, biodegradable y no tóxico. Sin embargo, debido a la gama de productos hortofrutícolas que existen en el mercado, aún queda por evaluar su efecto en muchos de ellos. El quitosano tiene la capacidad de estimular mecanismos de defensa en el fruto modificado, así también se están realizando estudios de sinergismo entre el quitosano y otros productos de origen natural como posibles alternativas de control a los problemas de poscosecha o frutos procesados (Bautista, Hernández, Velázquez, Bosquez y Sánchez, 2005).

Balboa (2011) manifiesta que la chirimoya, al ser un fruto tropical típico del climaterio, presenta una alta perecibilidad y tiempo de almacenaje limitado como fruto fresco, por ello la industrialización de la pulpa de chirimoya podría convertirse en una alternativa de conservación.

Sucapuca (2013) afirma que existe un elevado consumo de la pulpa de fruta, además de conservar las características nutricionales y sensoriales del fruto fresco. Es por ello que se busca nuevas alternativas de conservación, con el fin de desarrollar tecnologías simples y económicas que retrasen los procesos de deterioro y mantengan la calidad e inocuidad microbiológica de los productos. De acuerdo con Balboa (2011), la industrialización de la pulpa de chirimoya logrará abrir nuevos mercados, tales como heladerias, pastelerias, entre otros, reduciendo las pérdidas causadas por el deterioro de la fruta durante la manipulación y el transporte. Asimismo, producir pulpa de chirimoya se convertiría en una excelente oportunidad para obtener un producto con mayor valor, lo que conlleva a un incremento en la demanda de chirimoya, motivando al poblador del anexo La Merced de Chaute a mejorar la cadena productiva de este fruto, por tanto una alternativa de solución al problema socioeconómico presente en la zona.

La importancia del presente trabajo de investigación radica en buscar nuevas alternativas para la conservación de la pulpa de chirimoya estudiando la potencial actividad sinérgica entre el quitosano (CS) y el ácido cítrico (AC), con el fin de ampliar la vida útil, manteniendo las propiedades fisicoquímicas propias de la chirimoya fresca y a su vez conservar sus características sensoriales.

Por todo lo anterior expuesto, la presente investigación posee los siguientes objetivos:

Objetivo principal:

- Estudiar la actividad sinérgica entre quitosano de pluma de pota (*Dosidicus gigas*) y ácido cítrico en el pardeamiento enzimático de pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)

Objetivos específicos:

- Extraer el polímero de quitosano a partir de la pluma de pota (*Dosidicus gigas*).
- Caracterizar el polímero de quitosano extraído de la pluma de pota (*Dosidicus gigas*).
- Seleccionar la variedad de chirimoya apropiada mediante su rendimiento (% de pulpa, % de pepa, % de cáscara) y evaluación fisicoquímica (*p*H, acidez titulable, sólidos solubles totales, polifenoles totales).
- Obtener la caracterización fisicoquímica de la variedad de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) seleccionada.
- Evaluar el efecto sinérgico entre el quitosano y ácido cítrico, midiendo los cambios fisicoquímicos (acidez titulable, *p*H, sólidos solubles totales, polifenoles totales, actividad de la polifenoloxidasa, color) producidos en la pulpa de chirimoya.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Chirimoya

2.1.1. Origen y distribución geográfica del cultivo.

La chirimoya es una fruta andina, perteneciente a las anonáceas, nativa de América, pues era conocida por los primeros pobladores de Centro y Suramérica. Debido a la abundancia de anonas en muchos países de Meso (de México a Panamá) y Sur América, es difícil fijar con exactitud el lugar de proveniencia de esta especie (Cerdas, Umana y Castro, 2007).

Según Geilfus (1994), la chirimoya es una planta oriunda de la región andina en Colombia, Perú y Ecuador, cuyo cultivo se extiende a partir de nuestro país hacía México. Una evidencia del origen, son las representaciones en cerámica de los frutos *A. muricata* (guanábana) y *A. cherimola* (chirimoya), hallados en sepulturas prehistóricas de Perú. (Bonavia, Ochoa, Tovar & Palomino, 2004).

El Ministerio de Agricultura y Ganadería (2007) menciona que a pesar de las diferentes opiniones y/o suposiciones respecto al origen de la anona, lo cierto y común de los diferentes autores, es que el origen de este cultivo se ubica entre Meso y Sur América.

2.1.2. Clima.

Del género *Annona*, la chirimoya es la única especie que se adapta a un clima tropical y subtropical, entre 15 y 25° C. Esta fruta es muy sensible a temperaturas extremas, por debajo de 14° C no se logra una calidad apropiada del fruto, y a -2° C se perjudican hojas, tallos y frutos. Mientras que a 33° C y humedad relativa baja (<40%), la calidad del polen disminuye notablemente. El cuajado del fruto se ve afectado a temperaturas por encima de los 29° C; provocando caídas del fruto, así como daños por quemaduras en hojas y frutos que se encuentren muy expuestos al sol. El mejor desarrollo de la planta se da entre 1200 y 1800 msnm, además requiere de una humedad atmosférica relativa media entre 60 a 70% ((Morales, Medina, Criollo & Castro, 2006; PROINPA, 2009; FAO, 2006).

La Fundación Integra (s.f.) indica que los suelos aptos para cultivar chirimoya deben poseer un sustrato ligero, con materia orgánica y riego adecuado. La recolección, que es realizada manualmente, inicia cuando los frutos tienen una coloración verde clara, pero aún mantienen su firmeza, ayudando a evitar golpes y otros daños físicos durante el transporte.

2.1.3. Producción en el Perú.

Perú cuenta con 1 800 ha de chirimoya, alcanzando una producción de 20 000 t al año. Al finalizar el 2018, se obtuvo una producción de 20 867 t de chirimoya fresca, consiguiendo exportar entre el 1 y 2% de la producción total, 208 670 kg de chirimoya, por un valor FOB de US$ 547 460, mostrando un crecimiento notable respecto a los 140 396 kg exportados en el 2017 por un valor de US$ 376 350. Dentro de los países destino estuvieron Chile, España, Canadá, Italia y Países Bajos (Agencia Agraria de Noticias, 2015; Ramos, 2019; Koo, 2019).

Según Edgar Miranda, jefe de la Sede Lima Provincias de Sierra Exportadora, explicó que la región Lima concentra una producción entre 12 000 y 14 000 t, siendo los pueblos de San Mateo de Otao - Cumbe y Callahuanca, ambas pertenecientes a la provincia de Huarochirí, las zonas que disponen de 1 200 ha destinadas a la producción de esta fruta. Adicionalmente, otras regiones del Perú donde también producen chirimoya son Cajamarca, Apurímac y Junín (Agencia Agraria de Noticias, 2016; Ramos, 2019).

En una entrevista al líder en el sector frutícola del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y afiliado de la Asociación de Productores de Chirimoya de Cumbe (Huarochirí-Lima), William Daga, resaltó el trabajo de las entidades productoras en el Perú, que no solo abastecen al mercado nacional, sino también a un comercio exterior altamente competitivo (Torres, 2013).

2.1.4. Descripción.

La chirimoya es un conjunto carnoso (sincarpo) con forma primitiva, los carpelos se ubican en espiral uniéndose después de la fructificación. Cada sección de pulpa incluye una semilla dura de color negro o café en similitud a judía. La fruta posee forma cónica o de corazón, alcanzando entre 10 a 25 cm de longitud con 15 cm de ancho y un peso promedio de 250 a 800 g. En el momento que alcanza su madurez fisiológica se torna de una coloración verde pálido o cremoso; se considera que está sobremaduro cuando la piel se vuelve marrón oscuro o negro. La piel, ya sea delgada o gruesa es suave, con marcas similares a huellas dactilares, o también pueden encontrarse protuberancias de forma cónica o redondeada que resultan de las flores (Van Damme y Scheldeman, 1999). Además, la pulpa es blanca, jugosa y carnosa, con un grato aroma y delicioso sabor semi ácido (FAO, 2006).

2.1.5. Variedades botánicas.

La chirimoya es un fruto denominado botánicamente sin carpio, presenta una corteza de color variable que oscila desde el verde oscuro, amarillo, verde claro o negruzco dependiendo de la variedad (García, 2017). El departamento de Inteligencia de Mercados, apoyado por el Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX, 2017) y la Bioversity International (2008) reconocen cinco variedades de chirimoya clasificadas, según el tipo de exocarpo, en Laevis, Impressa, Umbonata, Tuberculata y Mamillata (Figura 1).

2.1.5.1. Leavis.

Flores (2013) describe las diferentes características botánicas de cada una de las variedades de chirimoya, donde menciona que carpelos poco aparentes y una piel lisa de la fruta son propias de la variedad Laevis. Balboa (2011) afirma que esta variedad también es llamada Lisa o suave, es una de las chirimoyas más finas, su pulpa es carnosa, jugosa y la cáscara generalmente delgada. Según el SIICEX (2017) este tipo de chirimoya es el de mayor calidad y se caracteriza por no presentar protuberancias.

2.1.5.2. Impresa.

Exhibe depresiones suaves en la piel del fruto, simulando placas originando figuras con relieve (Flores, 2013). Los frutos suelen ser de forma conoide, subglobosa, acorazonada y a veces arriñonada, conocidas como "chirimoya de los dedos pintados", la cual presenta una superficie tersa, cubierto de aureola en forma de U y sus carpelos asemejan a huellas digitales (Balboa, 2011).

2.1.5.3. Umbonata.

Los frutos de chirimoya de esta variedad poseen una piel gruesa reticulada, con abundantes carpelos y abultamientos o protuberancias pequeñas (Flores, 2013). Conocida también como anona picuda, por poseer cáscara gruesa, pulpa ácida y numerosas semillas. El fruto tiene la forma cónica, con la base algo umbilicada y cada carpelo tiene protuberancias aguzadas que forman una especie de apéndice puntiagudo que se prolonga hacia afuera en forma de picos (Balboa, 2011).

2.1.5.4. Tuberculata.

Son aquellos frutos de chirimoya con cubierta marcadamente reticulada y con protuberancias, al principio marcadas, pero que se atenúan al madurar, son características propias de esta variedad (Flores, 2013). La Bioversity International lo describe como frutos de protuberancia medianas.

2.1.5.5. Mamillata.

Se caracteriza por poseer frutos de piel altamente reticulada y con protuberancias carpelares muy marcadas (superior a la variedad Umbonata), manifestándose más durante el crecimiento del fruto que en la misma madurez (Flores, 2013).

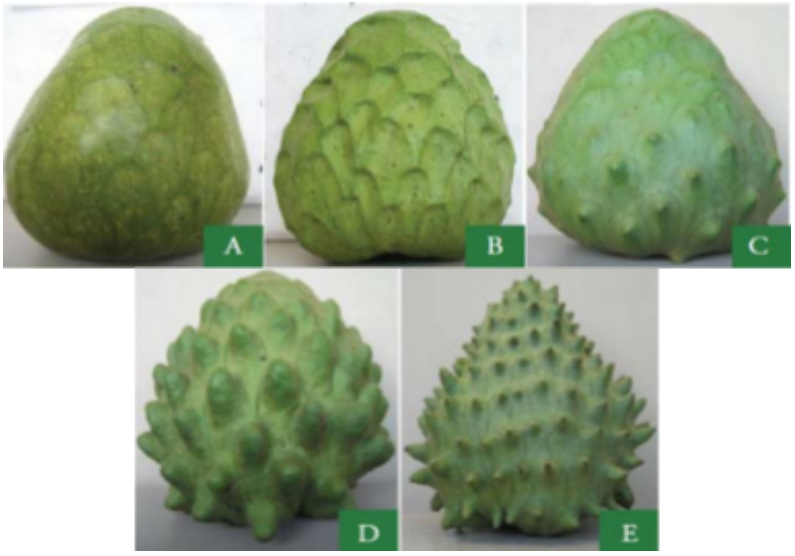


Figura 1. Variedad de chirimoya según el tipo de exocarpo:
(A) Laevis; (B) Impressa; (C) Umbonata; (D) Tuberculata; (E) Mamillata
Fuente: Pino (2018)

2.1.6. Variedades comerciales.

Según Flores (2013), las variedades comerciales de chirimoya cultivadas en nuestro país (Figura 2) son:

2.1.6.1. Ecotipo Cumbe.

Tiene origen en la provincia limeña de Huarochirí (cuenca Canchacalla, distrito de San Mateo de Otao). Los mayores rendimientos se obtienen en Lima, llegando a 11 toneladas por hectárea, donde el promedio nacional es de 6,5 toneladas por hectárea. El fruto es redondeada de forma acorazonada, de color verde claro con hoyos que se asemejan a huellas digitales. La pulpa es cremosa, formando algunos grumos de aspecto gelatinoso que alberga semillas de color negro brillante, los cuales se retiran con facilidad. Su sabor es dulce, parecido al de las fresas con un fino aroma a canela.

2.1.6.2. Blanca de Huanangui.

Es originaria de la localidad de Huanangui, provincia de Huaura. El fruto es redondo de forma acorazonada, de piel lisa y color verde pálido.

2.1.6.3. Yampa.

Sus frutos son originarios de la región de Cajamarca (localidad de San Pablo), con gran tamaño, lisas y coloración verde oscuro. Ideal para ser consumida en fresco, resistente al traslado, con elevada productividad y calidad.

2.1.6.4. Criolla.

Son frutos de tamaño medio con numerosas y uniformes protuberancias, forma ovalada, coloración verde oscuro con un tono negruzco en ciertos sectores. La planta se encuentra prominente a ser atacada por la mosca de fruta.

"En el mercado las variedades Yampa y Criolla se orientan al consumo interno y el ecotipo Cumbe se destina al mercado internacional como fruta fresca" (Mariano, 2003).

Figura 2. Variedades comerciales de chirimoya: A) Ecotipo Cumbe, (B) Blanca de Humangui, (C) Criolla
Fuente: Flores (2013)

2.1.7. Valor nutricional.

Tabla 1
Composición nutricional de la chirimoya

Composición	Moreiras *et al.*, (2003)	Besana portal agrario, (2008)	Reyes *et al.*, (2009)
	g/100 g de porción comestible		
Humedad	76,9	75,7	75,1
Proteína	1	1,0	1,2
Grasas	0,2	0,1	0,2
Carbohidratos	20	22	22,3
Fibra cruda	1,9	1,8	1,5
Cenizas		1,0	0,9
	mg/100 g de porción comestible		
Calcio	30	24	20
Fósforo	21	47	63
Hierro	0,6	0,4	0,7
Tiamina	0,08	0,06	0,09
Riboflavina	0,09	0,14	0,16
Niacina	0,9	0,75	1,62
Ácido ascórbico	18	4,3	3,30

Fuente: Moreiras, Carbajal, Cabrera y Cuadrado (2003); Besana Portal Agrario (2008); Reyes, Gómez, Espinoza, Bravo y Ganoza (2009)

El valor nutritivo de la chirimoya se debe, principalmente, al elevado contenido de azúcares (21,4%), principalmente fructosa y sacarosa; por otro lado, el contenido de proteínas y grasas es mínimo. Respecto a las vitaminas, destacan las del grupo B: B_1 o tiamina, B_2 o riboflavina, B_6 o piridoxina y la niacina, siendo la chirimoya la única fruta que aporta tantas vitaminas del grupo B, a igualdad de peso, comparando con otras. Respecto a los minerales, sobresale por ser rico en calcio, fósforo, hierro y potasio, tal como se aprecia en la Tabla 1. Entre las frutas frescas, solo algunas frutas como la naranja, el níspero, el dátil y la frambuesa contienen mayor cantidad de calcio que la chirimoya. Es fuente de vitamina C, que cumple una función antioxidante, contribuyendo en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos, además de favorecer la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones (Guevara, 1990; Pamplona, 2006, Merodio & De La Plaza, 1997).

El consumo de chirimoya es beneficioso para todas las edades, especialmente en la adolescencia, obteniendo la energía, vitaminas y minerales necesarios para sus actividades físicas y estudiantiles (Pamplona, 2006).

2.1.8. Usos.

Desde la era prehispánica hasta la actualidad, el hombre ha aprovechado cada parte de la planta de chirimoya, elaborando nuevos productos, estos se muestran en la Figura 3.

2.1.8.1. Frutos.

El fruto de la chirimoya es habitualmente consumida en forma fresca, y en menor medida como un alimento procesado. En la fruta fresca se consume la pulpa sola, aunque en la agroindustria también se elaboran productos a partir de la pulpa, tales como jugos, bebidas alcohólicas, helados y sorbetes caseros (Figura 3) (FAO, 2006). El olor, sabor y pulpa blanca son los principales atributos de la chirimoya que disponen de este fruto un gran potencial en el mercado (Brito, Rodríguez, Samaniego, Jaramillo & Vaillant, 2008).

Figura 3. Productos elaborados a partir de chirimoya.
Fuente: Rivas (2010).

Aunque el cultivo de chirimoya es importante, también se requiere elaborar nuevos productos como alternativa para el consumo de este fruto. Países como Perú, Bolivia y Chile se encuentran incursionando en este mercado (Sylva, 2009). Sin embargo, aún existen ciertas dificultades en el manejo y procesamiento industrial de la chirimoya, siendo el limitante para su uso en la industria de las frutas, esto debido al pardeamiento enzimático en la pulpa que provoca una coloración rosada (Van Damme & Scheldeman, 1999).

2.1.8.2. Hojas y semillas.

Márquez y Lara (como se citó en García, Gallegos, Madrigal y Zepeda, 2008) mencionan que la chirimoya también es utilizada con fines terapéuticos. Por ejemplo, la semilla molida la emplean como antiparasitario, mientras que se realizan infusiones de hoja y corteza, con el fin de tratar enfermedades en la piel.

2.1.8.3. Madera.

Los materiales vegetales resultantes de las podas son utilizados como combustible (leña), o para la construcción de mangos para herramientas, etc (Tacán, 2007).

2.2. Quitosano

2.2.1. Obtención.

En 1859, Rouget, trató a la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio, obteniendo un producto soluble en ácidos orgánicos. Luego, en 1894, Hoppe-Seyler nombró a esta quitina modificada, "quitosano". Actualmente, también es conocido como quitosana o chitosan (Lárez, 2003).

El quitosano se encuentra, naturalmente, en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, la fuente más importante de quitosano, a nivel industrial, lo constituye la quitina, que mediante el proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala (Lárez, 2006). García *et al*. (como se citó en Bullon, 2003) afirma que la fuente más abundante en la obtención de quitosano, son los desechos de la industria pesquera, donde los caparazones y exoesqueleto de crustáceos como el cangrejo, camarones, langostino, pota, calamares entre otros conforman grandes volúmenes que contaminan el medio ambiente, cuya eliminación resulta ser engorrosa y costosa; sin embargo, se encuentran disponibles en cantidades suficientes como para abastecer la industrialización del quitosano.

Lárez (2006) menciona que desde el punto de vista químico, los procesos para obtener la quitina y posteriormente quitosano son relativamente sencillos, esto se aprecia en la Figura 4.

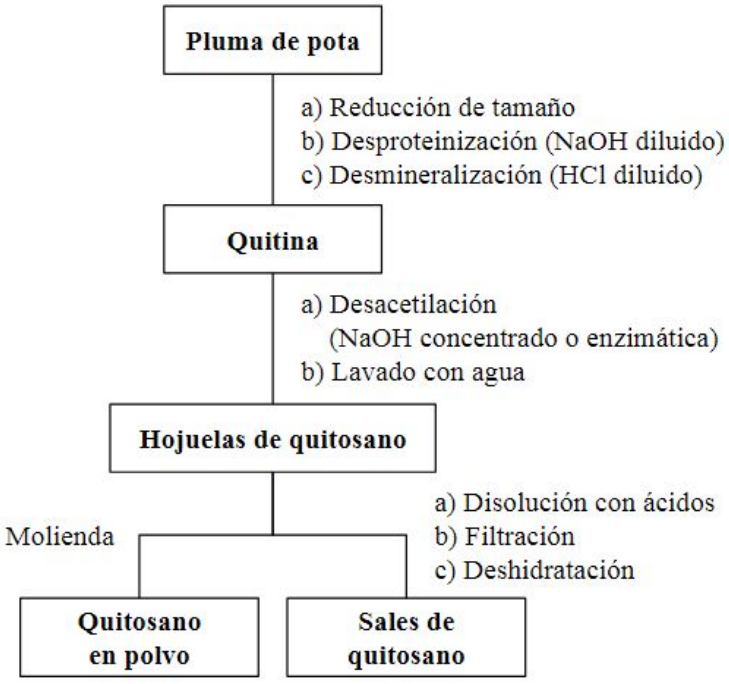


Figura 4. Esquema simplificado para la obtención de quitosano a partir de la pluma de pota.
Fuente: Modificado a partir de Lárez (2006)

2.2.2. Estructura y propiedades químicas.

El quitosano es un polisacárido formado por unidades de glucosamina y en menor cantidad de N−acetil D−glucosamina, unidos por enlace $\beta\,1-4$, observe la Figura 5 (Sato,

Mizutani & Tsuge, 1998). Es descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable. Se obtiene a partir de la desacetilación incompleta de la quitina al reaccionar con álcalis fuertes, sustituyendo sus grupos acetamida por grupos amina, mediante hidrólisis alcalina. Esta desacetilación produce modificaciones en su estructura química, mejorando las propiedades de reactividad y solubilidad. (Niquette, Monette, Azzouz y Hausler, 2004; Mármol, 2003; Lárez, 2006).

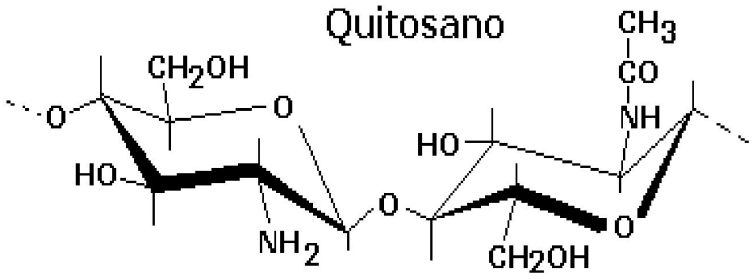


Figura 5. Unidades repetitivas de la estructura química del quitosano.
Fuente: Lárez (2003)

La quitina y el quitosano son biopolímeros que están químicamente emparentados, donde mediante una reacción de desacetilación, la quitina logra eliminar al menos el 50% de sus grupos acetilo, convirtiéndose en quitosano. Cuando el grado de desacetilación (% GD) de la quitina alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano, véase la Figura 6 (Lárez, 2006).

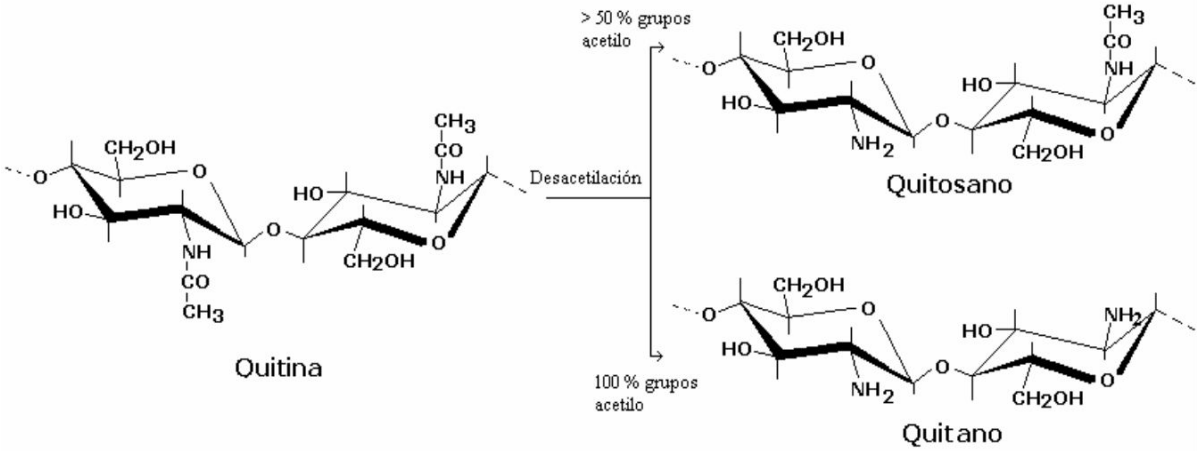


Figura 6. Relación estructural de la quitina, quitosano y quitano.
Fuente: Lárez (2006)

2.2.2.1. Peso molecular.

Si bien es cierto que las diferentes propiedades fisicoquímicas del quitosano y sus derivados aún no se conocen al detalle, se presume que la mayoría de estas, al igual que sus actividades fisiológicas y propiedades funcionales dependen de su peso molecular (Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe & Steurbaut, 2003). La variación de los pesos moleculares en la obtención del quitosano, está influenciada por las diferentes variables que se emplea en el proceso de desacetilación, como el tiempo, temperatura, concentración del hidróxido, naturaleza de la fuente de quitina y las condiciones de trabajo (Wu, 1988).

2.2.2.2. Grado de desacetilación.

La variación de la cantidad de monosacáridos que conforman el quitosano, origina una molécula con diferentes grados de desacetilación (75% a 95%) proporcionando compuestos con diferentes atributos y pesos moleculares que varían de 50 kDa a 2000 kDa. Así mismo, la viscosidad y el pKa se ven alteradas por el grado de desacetilación. Por este motivo, el quitosano no se refiere a un compuesto que presenta una estructura química definida, sino a polímeros con distintos grados de desacetilación (Singla & Chawla, 2001; Gouda, 2008). El contenido de nitrógeno del quitosano se encuentra entre 5% a 8%, dependiendo de su grado de desacetilación, en función a la distribución regular de los grupos aminos primarios alifáticos que contiene en su estructura (Castañeda, De la Fuente, Pacheco, Rodríguez, Barboza, 2011).

2.2.2.3. Solubilidad.

Lárez (2003) menciona que la formación de soluciones de quitosano son muy utilizadas en la actualidad debido a una mayor aplicabilidad de sus propiedades. Se habla de soluciones de quitosano gracias al valor de pKa = 5,6 que presenta este biopolímero, siendo completamente soluble en soluciones ácidas con *p*H menor a 6. La solubilidad del quitosano, se le atribuye a los grupos amina ($-NH_2$) libres en cada residuo monomérico de su molécula, los cuales pueden ser protonados, a partir de su neutralización con ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico, láctico, glutámico y málico) o ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico), formando sales de quitosano con grupos catiónicos de amina ($-NH_3^+$), el cual hace posible su completa solubilidad en agua, además de aumentar la repulsión eléctrica, permitiendo explicar de esta manera la propiedad del quitosano que tiene para enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes entre otras; así como su comportamiento floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas. Por otro lado, el quitosano logra disminuir su carga a un *p*H alto, por tanto, tiende a precipitar de la solución debido a la desprotonación de los grupos amina (Rodríguez *et al*., 2009; Singla y Chawla, 2001; Sugimoto, Morimoto, Sashiwa, Saimoto & Shigemasa, 1998; Crini, 2005).

2.2.2.4. Viscosidad.

Entre las propiedades más relevantes de los polímeros, incluyendo el quitosano, es su capacidad para formar soluciones viscosas; cuya aplicación podría ser como agentes de suspensión, espesantes o estabilizantes. Las soluciones de quitosano muestran propiedades viscoelásticas, las cuales se ven afectadas por su grado de desacetilación, peso molecular, concentración de la solución, el tipo de disolvente, la fuerza iónica, *p*H de la solución y la temperatura (Kumar, 2000).

2.2.3. Aplicación en la industria alimentaria.

La aplicación de quitosano y sus derivados en la industria de alimentos, se debe al conjunto de propiedades físicas, químicas y funcionales que presenta, las cuales han llamado la atención en los últimos años. Entre estas propiedades podemos mencionar los siguientes:

2.2.3.1. Agente antimicrobiano.

Ayala (2015) asevera que en los últimos años se ha convertido de gran relevancia evaluar el efecto antimicrobiano de biopolímeros como el quitosano, esto debido a las características que presenta como la biodegradabilidad, ser de origen natural y no tóxico que en concentraciones relativamente moderada presenta una actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano que se le atribuye al quitosano principalmente se debe a la capacidad quelante y a la presencia del grupo amino que presenta una carga positiva cuando el *p*H es inferior a 6,3 interactuando con la superficie de distintos microorganismos por estar formados por compuestos de carga negativa, sin embargo, pueden existir diferentes factores intrínsecos como extrínsecos que pueden modificar y afectar la actividad antimicrobiana negativamente (Shahidi,Arachchi & Jeon, 1999; Ayala, 2015).

2.2.3.2. Agente antioxidante.

La actividad antioxidante que presenta el quitosano se fundamenta en su gran capacidad para donar protones [H^+] puesto que las moléculas de oxígeno interactúa con átomos de hidrógenos activos que se encuentran en grupos hidroxilo o amino del quitosano, formando una macromolécula mucho más estable. Por otro lado, polímeros de quitosano con un peso molecular bajo afecta su actividad antioxidante de forma negativa, sin embargo, la capacidad quelante de iones metálicos de diferentes biopolímeros de quitosano con pesos moleculares distintos repercute en su poder antioxidante (Kim & Thomas, 2007; Tomida *et al*., 2010; Vinsova & Vavrikova, 2011).

2.2.3.3. Inmovilización de enzimas.

El quitosano posee diversas propiedades, siendo un eficiente material de soporte en la inmovilización de enzimas debido a los diferentes grupos funcionales que presentan en su estructura química, reaccionando de esta manera con diferentes enzimas logrando disminuir su actividad o estabilidad operacional (Salazar *et al*., 2014; Bickerstaff, 1997).

Krajewska (2004) señala que las principales características a presentar en un determinado material para su aplicación como soporte en la inmovilización de enzimas, es su elevada afinidad por las proteínas y la disposición de grupos funcionales propensos a sufrir cambios químicos al reaccionar con enzimas, además de no ser tóxico y fácil obtención.

2.2.3.4. Formación de películas biodegradables.

La aplicación del quitosano en la elaboración de películas y/o recubrimientos comestibles en frutas y verduras ha tomado importancia desde las dos últimas décadas debido a su característica biodegradable, comestible, no tóxico y actividad antimicrobiana, favoreciendo a la conservación de los alimentos, mejorando la calidad y extendiendo su vida útil debido a la inhibición del crecimiento de agentes patógenos como la *Escherichia Coli* y la *Salmonella Aureus* que son transmitidos en los alimentos y por la modificación de la atmósfera interna del vegetal logrando disminuir las pérdidas por transpiración. Convirtiendo de esta manera al quitosano en uno de los biopolímeros más estudiados en la actualidad (El Ghaouth, Arul, Ponnampalam & Boulet, 1991; Lárez, 2008; Giraldo, 2013).

2.2.4. Otras aplicaciones.

El quitosano sobresale debido a sus propiedades físicas y químicas, por ello, este producto está siendo aplicado en distintas áreas, algunas de estas se describen a continuación:

2.2.4.1. Agricultura.

El quitosano resulta ser efectiva en el control de enfermedades y plagas de los vegetales, donde su mecanismo de acción se encuentra vinculada a su estructura química, induciendo mecanismos defensivos de la planta. Por otra parte, la adición de quitosano a la tierra, favorece al desarrollo de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, incrementa la actividad y población microbiana del suelo, generando mejor disposición de los nutrientes (Mármol *et al*., 2011; Mulawarman, Hallmann, Bell, Holtwiesche & Sikora, 2001).

2.2.4.2. Tratamientos de aguas.

La capacidad quelante que posee el quitosano es útil en el tratamiento de aguas residuales que presentan alta turbidez y alcalinidad, debido a ser policatiónica, consiguiendo una acción floculante, útil para remover partículas coloidales sólidas o aceitosas, además de capturar metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas (Hernández, 2004; Lárez, 2006; Guibal, 2004). El quitosano presenta grupos aminas e hidroxilos muy reactivos, comportándose como un polielectrolito catiónico, valores menores a *p*H 6,5 posee una densidad de carga mayor, siendo atraído por las superficies cargadas negativamente y así formar quelatos con iones metálicos, por esta razón ha sido muy utilizada en el tratamiento y potabilización de aguas residuales, por el efecto que presenta en la separación de muchos iones metálicos tóxicos y coagular sustancias coloidales (Gacén y Gacén, 1996; Mármol *et al*., 2011).

2.2.4.3. Farmacéutica.

Las aplicaciones del quitosano en la industria farmacéutica se debe a la capacidad que tiene para generar fibras, membranas y películas, las cuales promueven su empleo al ser

preparadas en forma de microesfera o microcápsulas biodegradables. Actúa como un aglutinante de tabletas, material de recubrimiento, desintegrante, mucoadhesivo o excipiente. Por otro lado, las aplicaciones biológicas incluyen posibles usos en la reducción del colesterol, cicatrización de heridas y la actividad antimicrobiana. Por lo tanto, el quitosano tiene el potencial de ser utilizado no solo como un ayudante farmacéutico, sino también como un compuesto biológicamente activo (Chen *et al*., 2003; Singla y Chawla, 2001).

2.3. Ácido cítrico

2.3.1. Estructura química.

El ácido cítrico (ácido 2 − hidroxi − 1,2,3 − propanotricarboxílico, según la nomenclatura IUPAC) es un ácido orgánico considerado natural, sin embargo también puede ser sintetizado vía laboratorio. Este ácido abunda en la naturaleza encontrándose presente prácticamente en todo el reino vegetal, generando la acidez característico en los frutos cítricos como el limón, mandarina, lima, toronja, piña, naranja, ciruela, melocotón entre otros. Presenta un peso molecular de 192,12 g/mol siendo su fórmula molecular $C_6H_8O_7$. Entre sus principales características físicas destaca ser un sólido cristalino translúcido de forma granular a temperatura ambiente, además presenta un sabor ácido no desagradable e inodoro, consiguiendo este compuesto en forma de anhídrido o monohidratado (Muñoz, Sáenz, López, Cantú y Barajas, 2014; Rivada, 2008). La Figura 7 muestra la estructura química correspondiente al ácido cítrico.

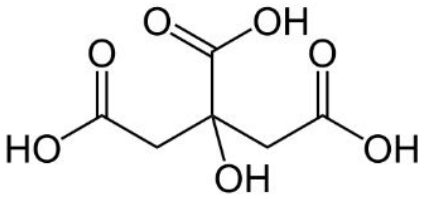


Figura 7. Estructura química del ácido cítrico.
Fuente: Muñoz *et al.* (2014)

2.3.2. Propiedades de los ácidos carboxílicos.

Estructuralmente los ácidos orgánicos están compuestos de ácidos carboxílicos, cuyo grupo funcional característico es el carboxilo (carbono unido a los grupos hidroxilo y carbonilo). Las diferentes propiedades físicas y químicas que presentan los ácidos carboxílicos, se debe principalmente a la presencia de los grupos carboxilo (− COOH) y al tipo de sustituyente con el que se enlaza clasificándose como un ácido aromático o alifático, tal y como se observa en la Figura 8 (Wade, 2012; Cornejo, 2017; Muñoz *et al*., 2014).

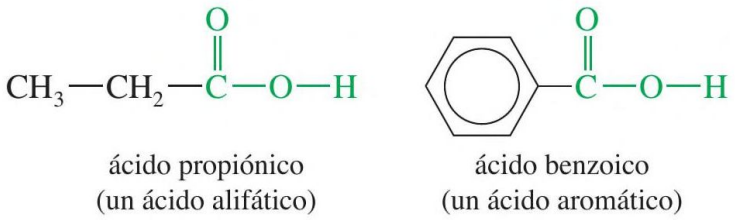


Figura 8. Clasificación de los ácidos carboxílicos.
Fuente: Wade (2012)

2.3.2.1. Propiedades físicas.

Cornejo (2017) afirma que la alta solubilidad de los ácidos carboxílicos en agua se debe a la presencia de los grupos carboxilo, este grupo funcional le confiere carácter polar a los ácidos, permitiendo formar puentes de hidrógeno con la molécula de agua. Además, menciona que moléculas de ácido carboxílico pueden unirse entre sí debido a la presencia de los dos átomos de oxígeno presente en el grupo carboxilo mediante un doble puente de hidrógeno formando un dímero cíclico, ver la Figura 9.

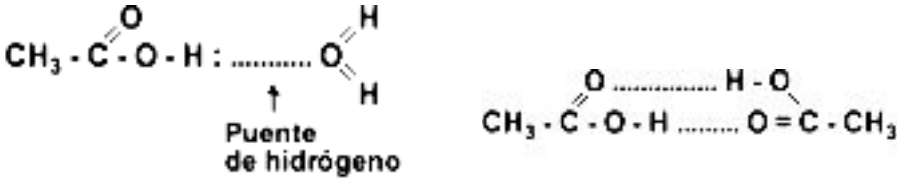


Figura 9. Formación de puentes de hidrógeno en los ácidos carboxílicos.
Fuente: Cornejo (2017)

Sin embargo, la solubilidad de los ácidos carboxílicos alifáticos disminuye conforme aumenta el número de átomos de carbono del grupo alquilo, siendo el ácido laúrico (dodecanoico) el primer ácido carboxílico sólido insoluble en agua (Cornejo, 2017; Wade, 2012). El bajo peso molecular que presentan algunos ácidos es el responsable de su solubilidad en agua y disolvente orgánico, además de generar un olor característico (Chang y Goldsby, 2007).

Por otro lado, el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC, s.f.) menciona las principales propiedades físicas del ácido cítrico, el cual destaca por su relativo alto punto de fusión y ebullición siendo estos 153° C y 175° C respectivamente. Presenta una densidad específica de 1,665 g/m^3 a 20° C y una solubilidad de 3,83 x 10^5 mg/L a 25° C. Este compuesto se puede obtener a partir de la extracción de frutos cítricos o también ser producidos a escala industrial mediante la fermentación de melazas.

2.3.2.2. Propiedades químicas.

Entre las principales características de los ácidos carboxílicos se encuentra el grado de acidez que este compuesto proporciona al disociarse en agua, formando un protón [H^+] y un anión carboxilato, tal como se observa en la Figura 10. Aunque, comparado con la acidez que genera la disociación de ácidos minerales (HCl, H_2SO_4) provocan un grado de acidez mucho

mayor al causado por los ácidos carboxílicos, sin embargo, genera una mayor acidez que otros grupos funcionales (−OH, −CHO, −CO). Como en todo ácido, es posible definir su constante de acidez (pKa) donde dicho valor se encuentra alrededor de 5 (Wade, 2012; Chang y Goldsby, 2007).

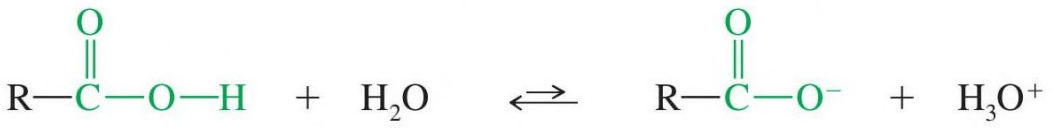


Figura 10. Disociación del ácido carboxílico en agua.
Fuente: Wade (2012)

Wade (2012) afirma que las sales de los ácidos carboxílicos presentan propiedades muy distintas al que causa los ácidos, otorgando una mayor solubilidad en agua y menor olor. Asimismo debido a la fácil interconversión que existe entre ambos, estas forman diferentes derivados de ácidos carboxílicos.

Por otra parte, Paredes y Espinosa (2009) menciona que los ácidos tricarboxílicos como el ácido cítrico tienen la propiedad de formar quelatos con iones metálicos mucho más estable que con los ácidos dicarboxílicos, como el ácido maleico o tartárico y mucho menos estable comparado con los quelatos formado por los ácidos monocarboxílicos.

2.3.3. Derivados de los ácidos carboxílicos.

Para Wade (2007) y Muñoz *et al*. (2014) los ácidos carboxílicos son compuestos que forman derivados mediante una hidrólisis ácida o básica sencilla, consiguiendo sustituir el grupo hidroxilo del ácido por otro grupo como haluros ácidos, ésteres, amidas, nitrilos o anhídridos (Figura 11).

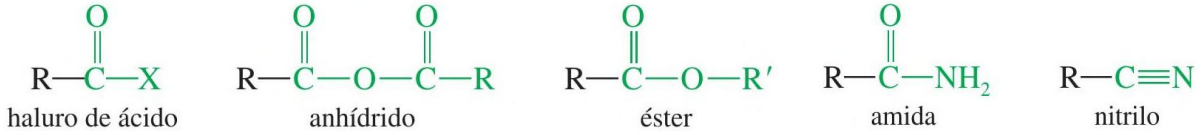


Figura 11. Derivados del ácido carboxílico.
Fuente: Wade (2012)

Wade (2012) señala que entre los derivados del ácido carboxílico, las amidas y ésteres muestran una gran importancia debido a las propiedades biológicas que generan, además de ser comunes en la naturaleza y en la industria química. Los ésteres producidos a partir de un ácido carboxílico se obtiene al sustituir el grupo hidroxilo (−OH) por un grupo alcoxilo (−OR) y se logra al combinar un alcohol con un ácido carboxílico produciendo el éster respectivo más una molécula de agua (Figura 12).

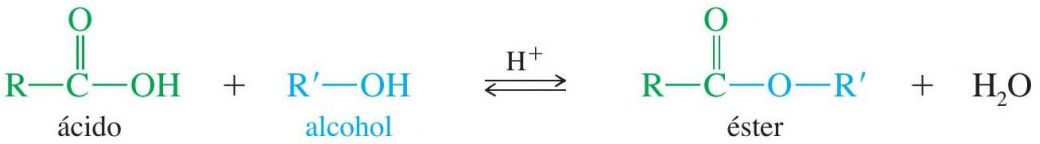


Figura 12. Formación de un éster a partir del ácido carboxílico.
Fuente: Wade (2012)

Mientras que una amida es el producto de la adición de un ácido carboxílico con una amina formando el carboxilato de amonio (sal) que al recibir calor, esta libera agua y forma un enlace amida (amidación), tal y como se observa en la Figura 13 (Wade, 2012).

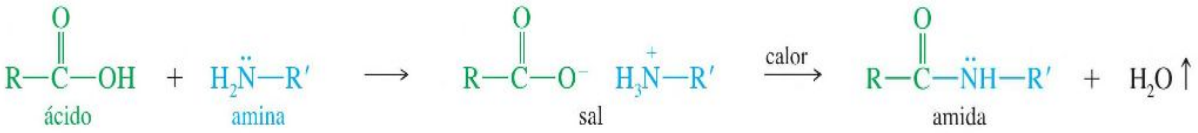


Figura 13. Formación de una amida a partir del ácido carboxílico.
Fuente: Wade (2012)

2.3.4. Aplicación en la industria alimentaria.

En la actualidad se observa un aumento e interés en la adición de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, en alimentos debido a las diferentes funciones y propiedades que estos o sus sales proporcionan. Entre las diferentes propiedades que presenta el ácido cítrico destaca su poder acidulante, capacidad amortiguadora o reguladora de *p*H, agente quelante de iones metálicos y emulsificante. A pesar de ello, la principal aplicación del ácido cítrico en la industria alimentaria, se debe a la acidificacion y control del *p*H que este otorga al producto final, puesto que un valor bajo de *p*H, provoca una disminución en la velocidad del crecimiento microbiano (bacterias), además de reducir los tratamientos térmicos como el escaldado de frutas y verduras debido a la inactivación de enzimas no deseables como la polifenoloxidasa (Muñoz *et al*., 2014; Papagianni, 2007). En la siguiente Tabla 2 se muestra algunas de las principales aplicaciones del ácido cítrico en alimentos.

Tabla 2
Utilización del ácido cítrico en alimentos

Alimento procesado	Funcionalidad
Bebidas	Proporcionar acidez y complementar los sabores de las frutas y bayas. Aumenta la eficacia de los conservantes antimicrobianos. Se utiliza en el ajuste del *p*H para proporcionar acidez uniforme
Jaleas y mermeladas	Proporcionar acidez. Ajustar el *p*H.
Dulces	Proporcionar acidez. Minimizar la inversión de la sacarosa. Producir color oscuro en caramelos duros. Actuar como acidulante.
Fruta congelada	Disminuir el *p*H para inactivar las enzimas oxidativas. Proteger el ácido ascórbico por inactivación de trazas de metales.
Productos lácteos	Emulsificar helados y quesos procesados, actuar como antioxidante y agente acidificante en productos de queso.
Grasas y aceites	Sinergismo con otros antioxidantes y como secuestrador.

Fuente: Muñoz *et al*. (2014)

Por otro lado, el Codex Alimentarius (1995) en su Norma General para los Aditivos Alimentarios (GSFA) señala que la dosis máxima de ácido cítrico permitido en la elaboración de concentrados para zumos de frutas es de 3000 ppm (mg de ácido cítrico/kg). Este valor será tomado en cuenta en la formulación con ácido cítrico debido a la semejanza con el producto procesado (pulpa de chirimoya) en el presente trabajo de investigación.

2.4. Pardeamiento enzimático

2.4.1. Definición.

El pardeamiento enzimático es la oxidación de compuestos fenólicos, catalizada principalmente por la enzima polifenoloxidasa (PPO). Esta oxidación produce quinonas las cuales se condensan y reaccionan rápidamente formando un conjunto de pigmentos oscuros indeseables (melaminas), causando una serie de cambios negativos en la calidad nutricional y sensorial, es por ello que el pardeamiento enzimático ha sido preocupación importante en la industria y ciencia de los alimentos (Friedman, 1997). Este tipo de pardeamiento se produce ampliamente en muchas frutas y verduras durante su manipulación, almacenamiento y/o procesado (pelado, maceración, corte, rebanado, triturado, pulpeado, etc), generando un significativo impacto económico tanto para los mismos productores como para la industria que los procesa, pues se estima que más del 50% de la pérdidas en frutas y verduras se produce como consecuencia del pardeamiento enzimático, siendo los de clima tropicales y subtropicales, como la chirimoya, lo más propensos a sufrir dicho pardeamiento (Jiang, Duan & Zheng, 2016).

2.4.2. Polifenoloxidasa (PPO).

La polifenoloxidasa (PPO) es una enzima (EC 1.10.3.1) que se distribuye ampliamente en plantas, frutas o verduras y su actividad es el principal responsable del pardeamiento enzimático, siendo clasificada por la Comisión de Enzimas (EC) como una oxidorreductasa. Esta enzima recibe diferentes nombres según el material biológico del que proceda, siendo denominada como tirosinasa en animales y polifenoloxidasa, difenol oxidasa, catecolasa o fenolasa en vegetales (Nevin-Ridley y Ramírez como se citó en Guerrero, 2009; Valero, 1993). Jiang *et al*. (2016) describen a la polifenoloxidasa como una metaloenzima que contiene al Cu^{+2} (0,2%) en su sitio activo, las cuales catalizan dos tipos de reacciones usando al O_2 como agente oxidante. Para Calvo (2007) la presencia de este metal en su centro activo es la característica estructural más importante de la enzima, debido a que estos dos átomos de cobre se encuentran unidos a histidinas, donde se sitúan aminoácido hidrofóbicos, con anillos aromáticos importantes para la unión de sustratos. En la actualidad no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del Cu en la oxidación de los compuestos fenólicos, sin embargo Álvarez (2009) propuso la ecuación estequiométrica mostrada en la Figura 14:

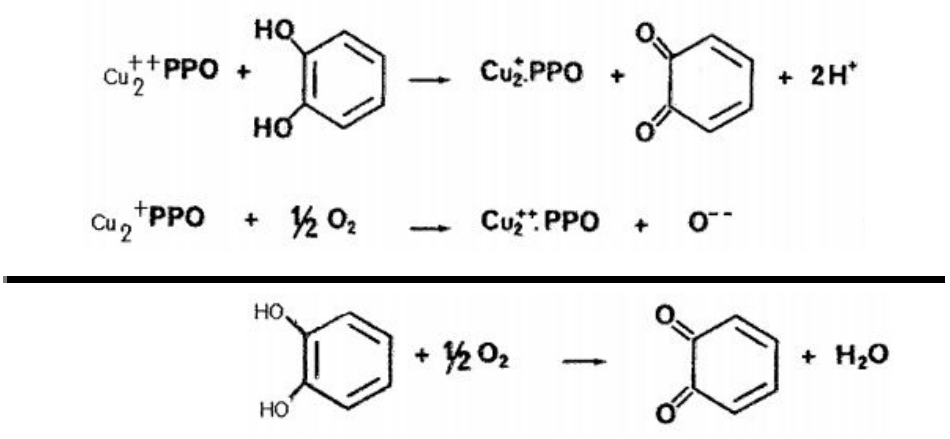


Figura 14. Participación del cobre en la oxidación de fenoles.
Fuente: Álvarez (2009)

2.4.3. Sustrato de la polifenoloxidasa.

Bello (2000), en su libro Principios generales de los alimentos, explica los principales sustratos que pueden dar inicio al pardeamiento enzimático, entre ellos tenemos los compuestos que responden a estructuras de monofenoles, orto-difenoles (o−difenoles) y polifenoles, con un grado de reactividad que dependerá de su estructura. Generalmente, los monofenoles reaccionan lentamente, debido a que primero se realiza una hidroxilación enzimática seguido de oxidaciones selectivas a comparación de los difenoles. El autor afirma que en frutas y verduras la enzima se encuentra en bajas concentraciones, por ende, la cantidad de sustrato limita la velocidad del pardeamiento, desde este punto de vista, los sustratos fundamentales que pueden ser causante de las reacciones propias del pardeamiento enzimático tiene que hallarse como los principales componentes fenólicos presentes en un determinado alimento de origen vegetal, véase la Figura 15, entre estos compuestos tenemos:

- El orto-difenol y derivados (obviando sus compuestos metilados) como el pirocatecol, 4 metil − catecol, el ácido cafeico y el ácido protocatéquico.
- Los derivados del aminoácido L − tirosina como la dopa (3,4 dihidroxi − fenilalanina (presentes en la papa) y la dopamina (3,4 dihidroxi fenil − etilamina (presente en el plátano).
- Los ácidos orgánicos incluyen en sus estructuras anillos aromáticos como el ácido gálico, ácido clorogénico (presente en manzanas, papas, granos de café, etc).
- Los compuestos flavonoides, que pueden encontrarse bajo la forma de antocianinas, antocianidoles, leucocianidol, flavonoles y flavanonas.
- Las ligninas, que son polímeros fenólicos responsables de las estructuras rígidas de muchos vegetales y los taninos (derivados pirogalicos).

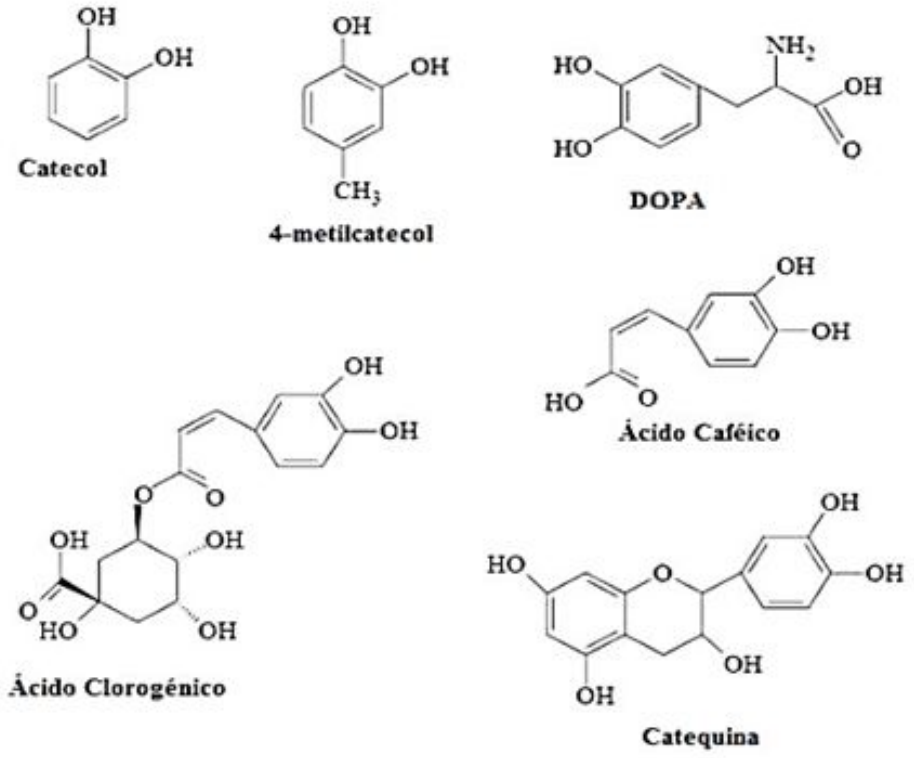


Figura 15. Estructuras de algunos sustratos naturales de la polifenoloxidasa.
Fuente: Jiang *et al*. (2016)

2.4.4. Mecanismo de acción.

Jiang *et al*. (2016) señala que el daño del tejido vegetal, provoca la ruptura de los plástidos, compartimento celular en el que se encuentra almacenado importantes compuestos químicos como la polifenoloxidasa, generando el contacto directo de esta enzima con los compuestos fenólicos liberados por la ruptura de la vacuola (principal orgánulo donde se almacena compuestos polifenólicos).

Siguiendo un mecanismo ordenado y para que la enzima actúe sobre el sustrato fenólico, el Cu^{+2} debe encontrarse reducido a Cu^{+}, estado en el que la enzima puede ligar primero al oxígeno, provocando la oxidación del metal ($Cu^{+} \rightarrow Cu^{+2}$) y formando a su vez un complejo con enlaces $O-O$ bien polarizados el cual logra producir la hidroxilación de monofenoles a $o-$difenoles, finalmente el ciclo culmina con la oxidación de estos $o-$difenol a quinonas (Belitz, Grosch y Schieberle como se citó en Gil, Rojano y Guerrero, 2012 ; Pérez, 2003). Dicho procedimiento se logra observar en la Figura 16.

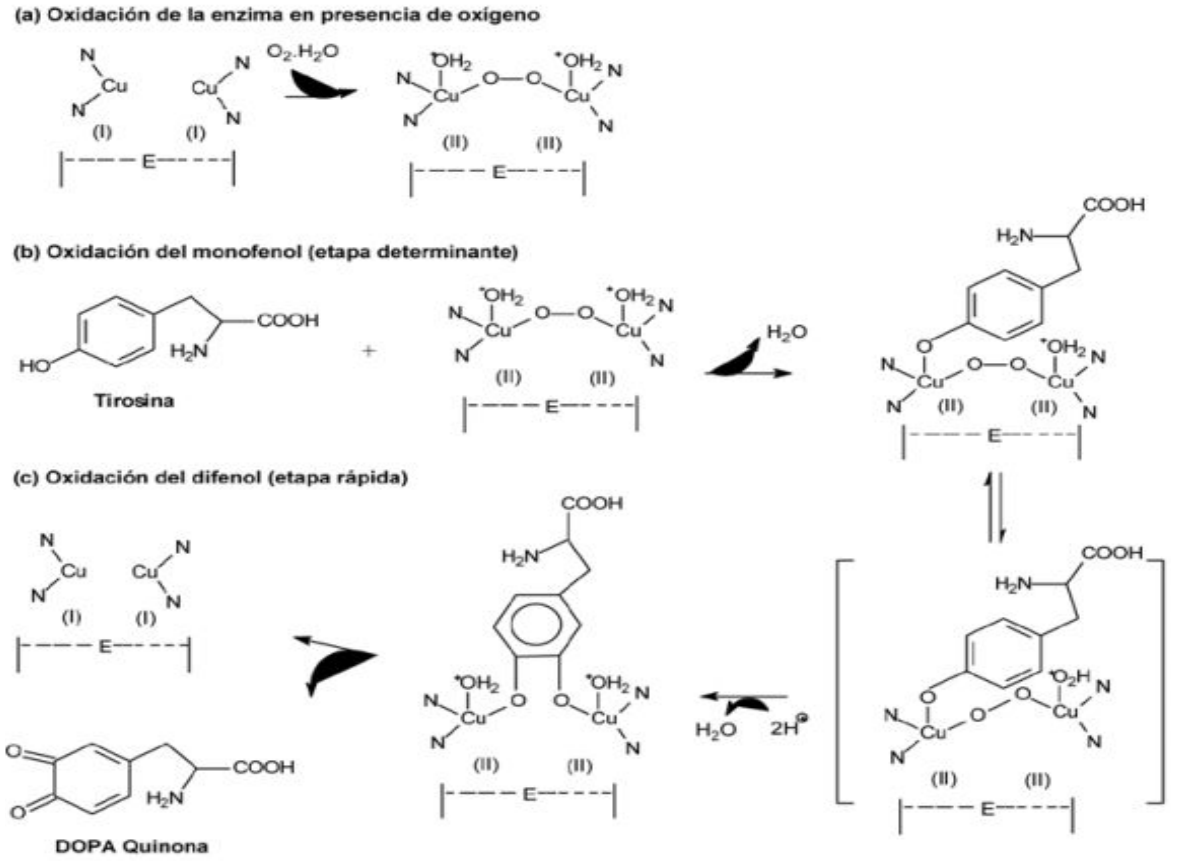


Figura 16. Mecanismo ordenado de la polifenoloxidasa en la oxidación de la tirosina.
(a) Oxidación de la enzima ($Cu^{+} \rightarrow Cu^{+2}$) en presencia de oxígeno (b y c) Oxidación de la tirosina
Fuente: Gil *et al*. (2012)

Bello (2000) menciona que el mecanismo de acción de la polifenoloxidasa en el pardeamiento enzimático es bastante complejo, distinguiéndose cinco etapas, siendo los dos primeros de naturaleza enzimática:

2.4.4.1. Reacción de hidroxilación (monofenoles a $o-$difenoles) por actividad de la cresolasa.

En esta etapa, el sustrato son los monofenoles que se caracterizan por ser en su mayoría incoloros, convirtiéndose en orto difenoles, asimismo incoloros, mediante una hidroxilación enzimática, la cual se logra debido a la actividad de la enzima cresolasa y que al intervenir una molécula de O_2, formando difenol y agua.

2.4.4.2. Reacción de oxidación (o−difenoles a o−quinonas) por actividad de la catecolasa.

En esta etapa el oxígeno molecular del aire participa como receptor de hidrógenos y en la actividad de la enzima catecolasa. En las dos primeras etapas, la presencia del cobre como parte de su grupo prostético de la polifenoloxidasa resulta esencial, debido a la intervención catalítica del cobre, que se realiza en diversas etapas, tal como se aprecia en la Figura 17.

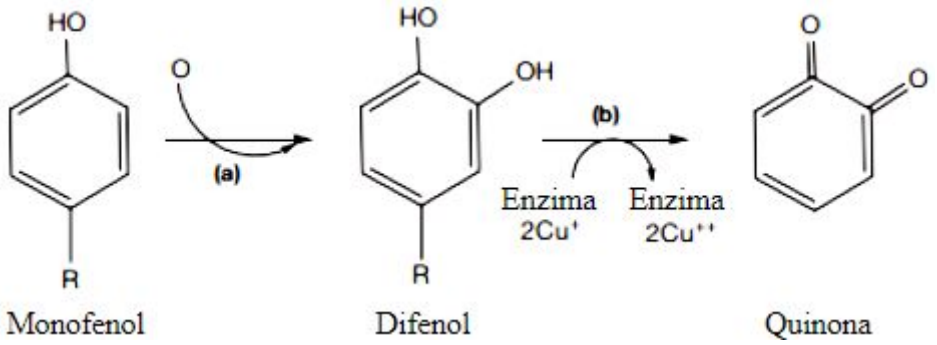


Figura 17. Mecanismo de acción de la polifenoloxidasa.
(a) Reacción de hidroxilación (acción de la cresolasa), (b) Reacción de oxidación (acción de la catecolasa)
Fuente: Jiang *et al*. (2016).

2.4.4.3. Hidroxilación química secundaria de las quinonas.

Una vez formadas las quinonas, de manera espontánea, ocurren un conjunto de reacciones. Entre una de estas tenemos la hidroxilación secundaria de quinonas al reaccionar con una molécula de agua, dando lugar a trihidroxibencenos, ver Figura 18.

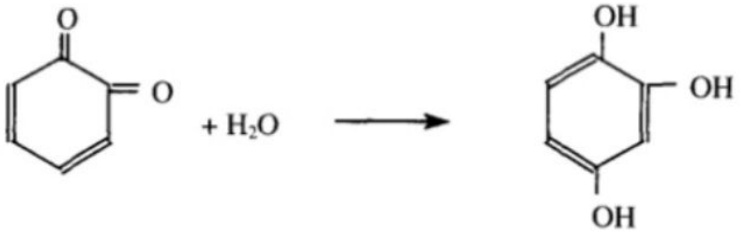


Figura 18. Hidroxilación química de la quinona.
Fuente: Bello (2000)

2.4.4.4. Cambios intramoleculares entre quinonas y fenoles.

Estos compuestos trifenólicos formados presentan una gran capacidad de reacción entre quinonas y fenoles, formando hidroquinonas, ver la Figura 19.

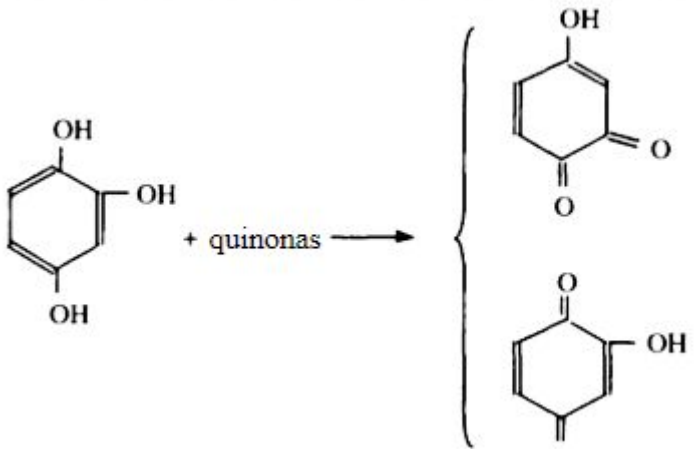


Figura 19. Cambios intramoleculares entre quinonas y fenoles en la formación de hidroquinonas. Fuente: Bello (2000)

2.4.4.5. Condensación de quinonas para dar lugar a polímeros.

Las hidroxiquinonas, anteriormente formadas, se condensan oxidativamente, formando polímeros de melaminas, que varían de colores como rosa o roja, consiguiendo el color característico pardo al final.

2.4.5. Actividad de la polifenoloxidasa.

La velocidad en la que el pardeamiento enzimático afecta a muchos alimentos de origen vegetal, depende en gran medida de la actividad específica de la polifenoloxidasa así como las concentraciones de compuestos fenólicos, el *p*H y la temperatura (Jiang *et al*., 2016). Para Amiot, Tacchini, Aubert & Nicolas (1992) la actividad de la PPO es particularmente creciente en frutas y hortalizas con elevados niveles de compuestos polifenólicos, además menciona que la especie, variedad y estado fisiológico del fruto influye en la intensidad del pardeamiento siendo el cobre, ubicado en el sitio activo de la enzima, el factor más importante para la actividad de la polifenoloxidasa (Pérez, 2003). Barberán & Espín (2001) por su parte señalan que algunas prácticas agronómicas como la fertilización, la falta de riego, las condiciones climáticas del cultivo y el estrés salino del suelo entre otros más, pueden afectar la actividad de la enzima. En tejidos vegetales que no sufrieron daño alguno, la enzima PPO y sus compuestos fenólicos permanecen separados (cloroplastos y vacuolas), por ende, no existe reacción, sin embargo al exponer la integridad de las células como en daños mecánicos durante el triturado, cortado o pulpeado, provoca una ruptura celular quedando en contacto la PPO y los compuestos fenólicos dando inicio al pardeamiento enzimático, esto se puede observa en frutos maduros, tejidos dañados, procesados y en tejidos afectados por fisiopatías (Morante *et al*., 2014).

2.4.6. Control del pardeamiento enzimático.

Debido al fuerte impacto económico que genera en la industria alimentaria, la inhibición del pardeamiento enzimático causado por la PPO en productos generalmente de origen vegetal (frutas y verduras) ha sido en la actualidad motivo de investigación. El control de este fenómeno requiere de un conocimiento bioquímico del tipo de sustratos fenólicos presentes en cada planta, nivel de compuestos reductores, nivel de accesibilidad del O_2, la naturaleza de los diferentes compuestos oxidables, la polimerización y degradación de las o-quinonas. Es por ello, necesario comprender muy bien el proceso de pardeamiento enzimático, con el fin de poder controlarlo eficazmente y obtener un producto de alta calidad que sea aceptable por los consumidores (Morante *et al*., 2014; Jiang *et al*., 2016). Para que se produzca este tipo de pardeamiento, hace falta que concurra tres factores esenciales, la presencia de sustratos fenólicos apropiados, la enzima PPO, con átomos de cobre en el sitio activo, además del oxígeno. Por lo tanto, controlar el inicio del pardeamiento resulta posible, si se procede sobre los dos últimos factores, pues no se puede eliminar el sustrato, aunque sí elegir la variedad que presenta menor cantidad de compuestos fenólicos (Bello, 2000).

Entre las tecnologías actualmente utilizadas en el control del pardeamiento enzimático se encuentra el uso de inhibidores de la PPO, agentes quelantes, acidulantes, compuestos reductores, recubrimientos comestibles, el tratamiento térmico, el envasado en atmósfera modificada o controlada y el almacenamiento en frío (Jiang *et al*., 2016). A continuación, se detalla el mecanismo de acción de las diversas formas para inhibir la enzima:

2.4.6.1. Tratamiento térmico.

Debido a que las enzimas presentan una estructura proteica, estas se pueden desnaturalizar fácilmente, debido a que son muy termolábiles cuando se calienta a temperaturas de 70 a 90° C, provocando que la actividad de la mayoría de estas queden destruida (Álvarez, 2009). Para Jiang *et al.* (2016) el tratamiento con calor es el método más utilizado para estabilizar los alimentos, debido a su capacidad para destruir microorganismos e inactivar las enzimas como la PPO. Esta enzima tiene un rango de temperatura donde se inhibe su actividad (75 a 90° C), pero el tiempo requerido para inactivar la enzima depende en gran medida del producto. Sin embargo, la aplicación de calor en varias frutas y vegetales se encuentra limitada por la poca resistencia que presentan a la modificación de sus características organolépticas, es por ello que no siempre suele ser usada, ya que puede provocar el rompimiento celular, facilitando la interacción entre las enzimas liberadas y el sustrato, por ende podría acelerar la aparición del pardeamiento (Bello, 2000). El principal problema de la chirimoya es el pardeamiento u oxidación de su pulpa, que en la familia anona solo se puede reducir con productos químicos, pues utilizar altas temperaturas provoca la liberación de taninos, trayendo como consecuencia el desarrollo de sabores extraños (Kobashigawa, 2018).

2.4.6.2. Inhibidores de la PPO.

Entre los principales inhibidores de la PPO encontramos a los ácidos carboxílicos aromáticos, como el ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico debido a su gran semejanza estructural con los sustratos fenólicos, siendo la fuerza de inhibición del ácido cinámico (no competitivo) mayor que el del ácido 4−hidroxicinámico (competitivo) y esta, mayor que el del ácido 4−metoxicinámico (no competitivo) (Janovitz, Richard, Goupy & Nicolas, 1990; Jiang *et al.*, 2016).

Los resorcinoles sustituidos son compuestos m-difenolicos que se encuentran estructuralmente relacionados con los sustratos fenólicos, actuando como inhibidor competitivo con la polifenoloxidasa, mediante la sustitución hidrofóbica con hexil, dodecil y grupos ciclohexil en la posición 4 del anillo aromático del resorcinol. La principal ventaja del 4−hexilresorcinol es la efectividad a bajas concentraciones, estabilidad química, habilidad para decolorar compuestos preformados y el alto sinergismo con el ácido ascórbico reduciendo las quinonas, mientras que el 4−hexilresorcinol se relaciona con la PPO (Gil *et al*., 2012; Mcevelily, Iyengara & Otwell, 1992; Otwell & Mcevelily, 1992).

Jiang *et al*. (2016) entre sus investigaciones observó que tanto el ácido cítrico como el ácido ascórbico pueden funcionar como inhibidores de la PPO gracias a su acción quelante y la especificidad dirigida hacia los residuos de histidina presentes en la estructura proteica de la PPO. Desafortunadamente, a pesar de que muchos de estos compuestos son bastante efectivos en el control del pardeamiento enzimático, a menudo su uso en alimentación está limitado por producir efectos adversos en la salud, debido a un coste efectivo o porque su acción es sólo temporal como el ácido ascórbico (Morante *et al*., 2014).

2.4.6.3. Acidulantes.

Los grupos ionizables de la estructura proteica de las enzimas se ven afectados por el *p*H del medio, estos grupos deben conservar su forma iónica apropiada con el fin de mantener la conformación del sitio activo, enlazarse con el sustrato o catalizar la reacción enzimática. Los cambios en la ionización de estos grupos son generalmente reversibles, sin embargo, variaciones extremas del *p*H pueden generar la desnaturalización irreversible de la enzima e incluso alterar la estabilidad de los sustratos, por lo tanto, la función que cumplen los acidulantes es mantener un *p*H por debajo del punto óptimo de la actividad de la PPO, además, se está empleando conjuntamente con antioxidantes, para conseguir un efecto sinérgico que ayude a retardar el desarrollo del pardeamiento (Gil *et al*., 2012).

Chahuayo (2014) y Silveira (2017) señalan que la PPO tiene una actividad óptima a valores de *p*H entre 5 y 7. La acidificación del medio, a través de la utilización de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ascórbico, málico, entre otros, generan valores de *p*H por debajo de 4, donde su actividad se reduce, obteniendo un control del pardeamiento. Entre los acidulantes más utilizados en la industria alimentaria tenemos al ácido cítrico debido a su presencia natural en tejidos en muchas frutas y vegetales (Morante *et al*, 2014).

2.4.6.4. Agentes quelantes.

El uso de agentes quelantes se debe a su propiedad para remover iones metálicos presentes en el sitio activo de las enzimas, provocando su inactivación (Gil *et al*., 2012). Se sabe que las enzimas polifenoloxidasas presentan dos átomos de cobre como grupo prostético, lo cual quelando a este metal se podría reducir su actividad (Gasull y Becerra, 2006). Entre los agentes quelantes utilizados, tenemos a los acidos policarboxilicos (cítrico, málico, oxálico, tartárico y succínico), a los polifosfatos, el ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y otras macromoléculas como proteínas y porfirinas, con gran capacidad para secuestrar el cobre del centro activo de la enzima (Bello, 2000; Pérez, 2003).

2.4.6.5. Agentes reductores.

Llamados también antioxidantes, estos compuestos pueden reducir las quinonas nuevamente a fenoles, o retrasar el desarrollo del pardeamiento enzimático. El ácido ascórbico es uno de los agentes antioxidantes más útiles empleados en la producción de pulpa y zumos de frutas por su capacidad de reducir las quinonas, antes de que se produzcan pigmentos coloreados. Además, este compuesto es muy reactivo, oxidándose a ácido dehidroascórbico (DHAA), generando la posibilidad de que reaccione con otros compuestos alterando la calidad de los frutos (Bello, 2000; Morante *et al*, 2014).

Derivados del azufre, sulfitos y la cisteína suelen emplearse para conseguir la inhibición de la actividad de la PPO actuando como agentes antioxidantes. Los derivados de azufre presentan diversas funciones en los alimentos, siendo entre los principales su actividad microbiana e inhibición del pardeamiento enzimático como el no enzimático, especies como el bisulfito (HSO_3^-), sulfitos (SO_3^{-2}) o metabisulfitos ($S_2O_5^{-2}$) ejercen un efecto competitivo con la PPO, debido al enlace que se forma entre este y el cobre del sitio activo de la enzima, adicionalmente este compuesto reacciona con las quinonas formando las sulfoquinonas, logrando una inhibición irreversible de la enzima (Gil *et al*., 2012). Para Sapers (1993) los sulfitos son los compuestos más efectivos para prevenir el pardeamiento enzimático. Sin embargo, a pesar de su efectividad en frutas y hortalizas, estos compuestos tienen limitaciones, pues afectan la salud (Morante *et al*., 2014). Otros antioxidantes empleados son los compuestos fenólicos sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA), aplicados en alimentación para proteger el sabor y color de los alimentos y algunos compuestos fenólicos naturales como tocoferol, derivados del ácido cinámico y flavonoides como la quercetina y el kaempferol (Ashie, Simpson & Smith, 1996).

Otros inhibidores son los compuestos sulfhidrilos como el mercaptoetanol, ditiotreitol y tiourea por su función como agentes reductores, sin embargo, las concentraciones necesarias para prevenir el deterioro del fruto no son permitidas en la alimentación. Por otro lado, la cisteína ha mostrado ser un inhibidor fuerte de PPO gracias a su capacidad reductora, aunque a pesar de ello, la concentración que se necesita para alcanzar altos niveles de inhibición tiene efectos negativos en el sabor de los frutos (Morante *et al*., 2014).

2.4.6.6. Envasado al vacío.

La concentración o accesibilidad del oxígeno influye considerablemente en la velocidad del pardeamiento enzimático, lo que resulta eficaz como método de control, el impedimento de contacto entre el O_2 molecular con los tejidos. No obstante, existe cierta dificultad tecnológica lo que restringe bastante su uso, además la exclusión del O_2 conduce a situaciones de anaerobiosis con posible desarrollo de esporas anaeróbicas, como los *Clostridium,* cuando los alimentos son conservados durante tiempos muy prolongados. La elevada concentración de O_2 puede ser reemplazado por el N_2 o CO_2 obteniendo una atmósfera modificada con el fin de reducir o prevenir el pardeamiento provocado por la PPO. Es por ello, que los envases impermeables, películas comestibles, envasado en atmósfera modificada o atmósfera controlada son algunas de las opciones que también se puede obtener para dicho fin (Jiang *et al*. 2016; Bello, 2000).

2.4.6.7. Recubrimiento comestible.

Las películas o recubrimientos, utilizados como aplicaciones alternas para prevenir el pardeamiento en frutas mínimamente procesadas, son considerados como ingredientes o aditivos alimentarios dependiendo la función que desempeñen (Guilbert, Gontard & Gorris, 1996), siendo la función principal estabilizar y extender la vida útil de frutas procesadas, creando una micro atmósfera controlada que restringe el intercambio de gases, limitando la entrada del O_2, una disminución de la tasa de respiración, retraso en la producción de etileno, reducción en las pérdidas de humedad y de compuestos volátiles deseables (Baldwin, Nisperos & Baker, 1995). Los compuestos utilizados para formular diversos tipos de recubrimientos son: lípidos, proteínas, polisacáridos e hidrocoloides. Asimismo, otra ventaja de los recubrimientos comestibles es que suelen emplearse como soporte para ciertos agentes antioxidantes y acidulantes que ayudan a prevenir el pardeamiento y el crecimiento de microorganismos (Baldwin, Nisperos, Chen & Hagenmaier, 1996; Pérez, 2003).

En los últimos años, se han investigado exhaustivamente los recubrimientos de quitosano para el control del pardeamiento enzimático en frutas frescas y hortalizas después de la cosecha, mostrando un gran potencial de aplicación comercial (Jiang *et al*., 2016).

2.4.6.8. Almacenamiento en frío.

Cantwell, 1992 y Cantwell *et al*., 1996 (como se citó en Pérez, 2003) manifiestan que el uso de bajas temperaturas es una de las medidas normalmente empleadas para el control de la actividad enzimática durante el manejo, procesamiento y almacenamiento de frutas u hortalizas mínimamente procesadas. Mantener los productos a temperaturas bajas, no solo reduce la actividad enzimática que son responsables del pardeamiento, si no que además reduce considerablemente las velocidades metabólicas, contribuyendo en el incremento de la vida útil del producto. Cabe resaltar que por debajo del punto de congelación puede moderar o incluso impedir el desarrollo y crecimiento de los microorganismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El desarrollo del procedimiento experimental se llevó a cabo en el "Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica" y el "Laboratorio de Síntesis Orgánica" del departamento de Química Orgánica correspondiente a la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Materia prima

- Chirimoya procedente del anexo La Merced de Chaute, distrito de San Bartolomé, provincia de Huarochirí, región Lima, ubicada a 2491 msnm.
- Quitosano obtenido de la quitina extraída a partir del residuo pluma de pota recolectada en el Terminal Pesquero del distrito de Ventanilla (Callao - Perú).

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Insumos.

- Ácido cítrico (E330) - Procedente de la empresa Marva S.A.C.

3.3.2. Materiales de vidrio u otros.

- Vasos beaker de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 2 L y 5 L.
- Viales transparentes con tampones de goma de 10 ml.
- Bureta graduada de 50 ml con tapón de PTFE.
- Matraz erlenmeyer de 250 ml.
- Matraz aforado de 100 ml y 250 ml.
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 20 ml y 50 ml.
- Pipeta Pasteur de 3 ml.
- Placas de Petri.
- Bagueta de agitación.
- Desecador con tapa de bola.
- Propipeta.
- Tubos centrífuga de fondo cónico con tapa rosca de 14 ml.
- Tubos centrífuga de fondo plano con tapa rosca de 50 ml.
- Probeta de 100 ml.
- Crisoles de porcelana con tapa.
- Cubetas de plástico de 3 ml para espectrofotometría visible.
- Viscosímetro de Ostwald.
- Picnómetro 50 ml.

3.3.3. Utensilios.

- Tela de organza.
- Puntas para micropipetas (Color: amarillo 50 uL y azul 1000 uL).
- Soporte universal y pinza doble para buretas.
- Pinzas 3 punta dedo abrazaderas.
- Cuchillos de acero inoxidable.
- Pack de cucharas de plástico.
- Baldes plásticos industriales de 20 L con tapa.
- Palos de madera cuadrados.
- Coladores redondos de plástico.
- Frasco de vidrio cilíndrico con tapa rosca (Capacidad 115 ml).
- Bolsas de polietileno (7x10).
- Selladora de bolsas 220 V 60 Hz (Safari impulse sealer).

3.3.4. Instrumentos.

- Medidor portátil de *p*H/ORP (marca HANNA Instruments, modelo HI 8424).
- Refractómetro de mano (marca ATC, rango de medición 0 - 30% Brix).
- Micropipetas de 5 a 50 uL y de 100 a 1000 uL (marca Accumax PRO).
- Agitador magnético (marca IKA®, modelo RCT basic. Velocidad entre 0-1500 rpm).
- Termómetro de mercurio (marca B&C Germany. Temperatura entre -10 a 360° C).
- Cámara digital (marca Canon, serie SX610 HS, pixeles 18x).

3.3.5. Reactivos.

- Perlas de hidróxido de sodio 99%.
- Hidróxido de sodio (procedente de la empresa Pflucker S.A.).
- Indicador de fenolftaleína al 1%.
- Agua destilada.
- Ácido gálico.
- Etanol puro.
- Reactivo de Folin Ciocalteu (LR Reagents AR - CDH).
- Carbonato sódico 7,5%.
- Pirocatecol.
- Fosfato disódico.
- Acetato de sodio.
- Hipoclorito de sodio a 10 ppm de Cl.
- Bromuro de potasio.
- Ácido acético glacial (marca J.T.Baker).

3.3.6. Equipos.

- Balanza comercial de mesa (marca KAMBOR, modelo ACS-30-JC51. Capacidad programable de 30 kg).
- Balanza digital de mesa (modelo SF - 400A. Capacidad 2 g - 5000 g).
- Balanza analítica (modelo ALC-210.4. Capacidad 0,1 mg - 210 g).
- Horno (marca Blue Park, modelo NB-9030A. Temperatura máxima 250° C).
- Cámara de secado (marca Binder, modelo ED 23. Temperatura máxima 300° C).
- Horno incubadora (marca Precision Thelco, modelo 17. Temperatura máx. 300 °C).
- Horno de mufla (marca Blue M, modelo M10A-1A. Temperatura máxima 2000° C).
- Espectrofotómetro (marca Thermo Scientific, modelo Helios Beta UV-Vis).
- Espectrofotómetro Infrarrojo FTIR (marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10).
- Centrífuga (marca GREETMED, modelo GT119-100T. Velocidad máx. 4000 rpm).
- Baño ultrasónico (marca Branson, modelo 1510R- MT. Capacidad 1,9 L).
- Licuadora (marca Oster, modelo 465-5. Velocidad 1-3V).
- Licuadora industrial (marca The Royal Service, modelo RSS-V20. Capacidad 20 L).
- Refrigerador-congelador (marca LG, modelo GT29WPPDC. Capacidad 254 L).

3.4. Procedimiento experimental

3.4.1. Obtención del quitosano.

La Figura 20 muestra el diagrama de flujo empleado para la obtención del polímero de quitosano.

Figura 20. Proceso de extracción y obtención del quitosano a partir de la pluma de pota.

La obtención de quitosano fue desarrollado en base a los métodos reportados por el autor Castro (2017), adaptados a las condiciones del lugar de trabajo.

3.4.1.1. Recepción.

Los residuos de pluma de pota, empleados en la presente investigación, fueron recolectados y trasladados a las instalaciones del "Laboratorio de Síntesis Orgánica" del Departamento de Química Orgánica en la Facultad de Química e Ingeniería Química.

3.4.1.2. Lavado y picado.

Se realizó un lavado con la finalidad de reducir cualquier tipo de residuo. Se trabajó con 2 kg de pluma de pota, las cuales fueron cortadas previamente con cuchillos de acero inoxidable, para luego triturarlas con ayuda de una licuadora industrial, facilitando el proceso de la reducción de tamaño.

3.4.1.3. Desproteinización.

Las plumas de pota trituradas se sometieron a cocción en una solución de NaOH al 10% a 60 ºC durante 1,5 h con agitación constante, para ello se utilizaron baldes y palos; con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de proteína presente en la materia prima, siendo este proceso de desproteinización una reacción exotérmica (Castro y Vidal, 2015).

3.4.1.4. Lavado.

Se retiró el líquido sobrenadante y se lavó el precipitado (quitina) con abundante agua potable, por lo que fue necesario utilizar coladores y tela de organza. Este proceso se repitió varias veces hasta obtener un *p*H cercano a 7.

3.4.1.5. Desacetilación.

Con la finalidad de eliminar los grupos acetilo de la quitina, obtenida luego del proceso de desproteinización, y convertirse en quitosano, se trató con una solución de NaOH al 50% a 90 ºC con agitación constante durante 2 h.

3.4.1.6. Lavado.

Nuevamente se descartó el líquido sobrenadante para que se recupere y lave varias veces el precipitado (quitosano) hasta llegar a obtener un *p*H cercano a 7.

3.4.1.7. Secado.

El secado se realizó en una cámara de secado a 40° C durante 72 h.

3.4.1.8. Almacenamiento.

El quitosano obtenido fue almacenado en un recipiente hermético de vidrio y a temperatura ambiente.

3.4.2. Obtención de la pulpa de chirimoya.

En la Figura 21 se aprecia el diagrama de flujo seguido para obtener cuatro tratamientos de pulpa de chirimoya estandarizadas.

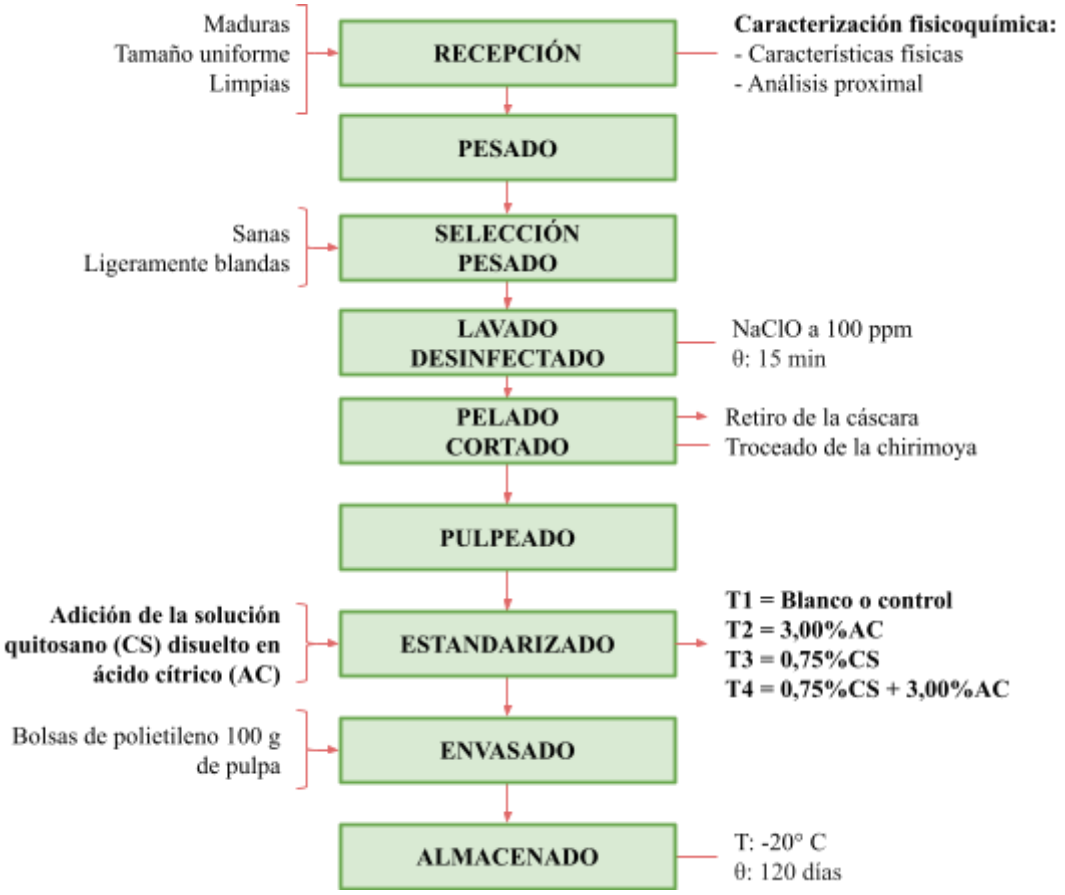


Figura 21. Flujograma para la obtención, envasado y almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

A continuación se describe cada operación realizada para obtener pulpa de chirimoya:

3.4.2.1. Recepción.

La fruta, una vez cosechada, fueron transportadas del lugar de origen a las instalaciones del "Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica" en la Facultad de Química e Ingeniería Química. Se realizó un muestreo del lote cosechado, en donde se evaluaron las características sensoriales y fisicoquímicas para su posterior aceptación o rechazo; finalmente, se realizó un pesado de toda la materia prima recepcionada (Yali y Loarte, 2015).

3.4.2.2. Selección / Pesado.

Una vez aceptado el lote, la selección se realizó con el fin de separar las frutas sanas de las descompuestas o golpeadas debido al transporte, que posiblemente afectarían la calidad de la pulpa; además de buscar obtener una homogeneidad en la maduración, tamaño, limpieza,

misma variedad y frescura. Una chirimoya con aceptables características sensoriales indica que es adecuada para el proceso (Yali y Loarte, 2015; Balboa, 2011).

El pesado permitió conocer con exactitud la relación entre la cantidad materia prima (chirimoya) que ingresó al proceso y la cantidad de fruta que se encuentra deteriorada o sin madurar. Adicionalmente con este parámetro, obtenemos el porcentaje de rendimiento del fruto, siendo un indicador de calidad del fruto (Fuertes y Gavilánez, 2012).

3.4.2.3. Lavado / Desinfectado.

Tiene como propósito disminuir la carga microbiana que naturalmente contienen las cáscaras, a fin de obtener una pulpa de calidad. Primero se lavó toda la chirimoya con agua potable. La desinfección se realizó utilizando una solución de hipoclorito de sodio a 100 ppm durante 15 min (Balboa, 2011).

3.4.2.4. Pelado / Despepitado.

El despepitado y cortado se realizó en forma manual con cuchillo de acero inoxidable. Para facilitar el despepitado de la fruta, se picó en cubitos de aproximadamente 1 cm de lado (Yurivilca, 2002).

3.4.2.5. Pulpeado.

La fruta se sometió a un proceso de reducción de tamaño, por lo que, se obtiene una especie de puré. Esta operación se realizó en una licuadora (Balboa, 2011; Barrenechea, Campos, Delgado, Jorge y Luján, 2018; Yali y Loarte, 2015).

3.4.2.6. Estandarizado.

En esta etapa se adicionaron las soluciones preparadas de quitosano con ácido cítrico a la pulpa de chirimoya en una relación de 1:27 respectivamente. Este proceso se llevó a cabo en recipientes mezcladores, al final de este proceso se obtuvieron todos los tratamientos para su posterior evaluación.

3.4.2.7. Envasado.

La pulpa de chirimoya se envasaron en bolsas de polietileno conteniendo 100 g de pulpa. El envase estaba completamente limpio, presentando ciertas características como poca permeabilidad y resistencia a altas y/o bajas temperaturas (Fuertes y Gavilánez, 2012).

3.4.2.8. Almacenado.

La pulpa de chirimoya fue evaluada durante 120 días (cada 20 días), por ello se almacenaron a -20° C, prolongando la vida en anaquel y manteniendo durante mayor tiempo su calidad. Para ello se utilizó una refrigeradora-congeladora (Shankar, 2009).

3.5. Método de análisis

3.5.1. Caracterización del quitosano obtenido.

La caracterización del quitosano se realizó en base a la propuesta del autor Castro (2017).

3.5.1.1. Humedad y cenizas.

- *Humedad.*

Se lavó y secó completamente una placa petri, luego se pesó aproximadamente 1,5 g de quitosano registrando el peso exacto de la muestra y la placa. Luego fue llevado a estufa durante 48 h a 70° C obteniendo un peso constante. La muestra se retiró de la estufa y se colocó en un desecador hasta su enfriamiento a temperatura ambiente. Finalmente se registró el peso final calculando el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso muestra de quitosano}} \times 100\%$$

Donde:

Peso inicial : Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano (g).
Peso final : Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano seco (g).

- *Cenizas.*

Para la determinación del porcentaje de cenizas primero se lavó y secó completamente un crisol el cual se registró su peso. Luego se añadió aproximadamente 1,5 g de muestra seca de quitosano donde también se anotó su peso exacto. El crisol con la muestra se llevó a una mufla durante 5 h a 500° C, pasado el tiempo se retiró hacia un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Finalmente se registró el peso del crisol con la muestras de cenizas de quitosano. Mediante la siguiente fórmula se obtuvo el contenido de cenizas:

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100\%$$

3.5.1.2. Viscosidad y peso molecular.

- *Viscosidad.*

- Preparación de soluciones:

Se preparó 500 ml de solución buffer (0,2 M en ácido acético y 0,1 M en acetato de sodio), luego con la muestra de quitosano se preparó una solución patrón (Q1) pesando 0,6 g de quitosano (peso exacto) disuelto en 100 ml de la solución buffer, se dejó agitando durante 24 h para lograr su completa disolución. Pasado el tiempo de agitación, se realizaron 4 diluciones a la mitad de la concentración cada una, a partir de la solución de quitosano patrón (Q1) obteniendo las siguientes disoluciones Q 1/2, Q 1/4, Q 1/8 y Q 1/16.

- Procedimiento:

En un baño maría a 30° C se introdujo el viscosímetro de Ostwald donde se midió por cuadruplicado el tiempo de flujo al trasvasar 10 ml de las siguientes soluciones: agua destilada, buffer, Q 1/16, Q 1/8, Q1/4 y Q1/2 (se trabajó en ese orden). Antes de cada medida se dejó calentar durante 5 min cada solución. Finalmente se halló la densidad de cada solución preparada con el uso de un picnómetro de 50 ml.

- Cálculos:

Con los datos obtenidos se calculó el tiempo promedio (t_p) y densidad (ρ) para cada una de las soluciones preparadas. La viscosidad (η) de las soluciones se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\eta = B \times \rho \times t$$

Donde:

η : Viscosidad de la solución.

ρ : Densidad de la solución.

t : Tiempo de flujo de la solución.

B : Constante del viscosímetro.

La constante del viscosímetro (B) se calculó mediante los datos de la densidad y viscosidad del agua a 30° C (según tablas termodinámicas).

La viscosidad intrínseca de la muestra de quitosano se determinó mediante el punto de intersección de las gráficas Ln (η_r /C vs C y η_e /C vs C cuando la concentración es igual a cero (C = 0). Los cálculos respectivos para hallar η_r y η_e se detalla en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

Nomenclatura y fórmula viscosimétrica

Símbolo	Nombre	Unidades
η	Viscosidad de la solución	P (poise) o Pa.s
η_s	Viscosidad del solvente	P (poise) o Pa.s
$\eta_r = \eta/\eta_s$	Viscosidad relativa	Sin unidades
$\eta_e = \eta_r - 1$	Viscosidad específica	Sin unidades
Ln (η_r /C)	Viscosidad inherente	ml/g
η_e /C	Viscosidad reducida	ml/g
[η]	Viscosidad intrínseca	ml/g

Fuente: Castro (2017)

- *Peso molecular.*

Mediante la ecuación de Mark-Houwink se determinó el peso molecular del quitosano expresado en kDa, luego de conocer los valores de la viscosidad intrínseca y el grado de desacetilación de dicho polímero.

$$[\eta] = K(\overline{M})^{\alpha}$$

Donde:

η : Viscosidad intrínseca (ml/g).

K, α : Constantes que varían según el grado de desacetilación del polímero.

$\overline{M}$: Peso molecular (kDa).

Mediante la siguientes ecuaciones se halló los valores de las constante K y α en función del porcentaje del grado de desacetilación.

$$K = 1{,}64 \times 10^{-30} \times (\%GD)^{14}$$

$$\alpha = 1{,}82 - 1{,}02 \times 10^{-2} \times (\%GD)$$

Donde:

%GD : Es el porcentaje del grado de desacetilación del quitosano.

K : Constante característico del polímero/disolvente (ml/g).

3.5.1.3. Grado de desacetilación.

- *Grado de desacetilación por espectroscopía infrarroja.*

Se mezcló aproximadamente 2 mg de muestra de quitosano con 98 mg de KBr hasta conseguir una mezcla homogénea. Luego se formó una pastilla manteniendo la mezcla en el pastillador durante 30 min, por último, se colocó la pastilla formada en el equipo IR. Mediante el software del equipo se obtuvo el espectro de la muestra, reportando las absorbancias para la frecuencia de 1320 cm^{-1} y 1420 cm^{-1}. El grado de desacetilación se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \ GD = 87{,}8 - 31{,}92 \frac{A_{1320}}{A_{1420}}$$

3.5.2. Selección de la variedad de chirimoya.

El departamento de Inteligencia de Mercados, apoyado por el Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX) y la Bioversity International reconocen cinco variedades de chirimoya clasificadas, según el tipo de exocarpo, en Laevis (Lisa), Impressa, Umbonata, Tuberculata y Mamillata. Solo tres de estas variedades (Lisa, Impressa y Umbonata) se cultivan en el anexo La Merced de Chaute ubicado en la provincia Huarochirí, región Lima lugar donde procede la chirimoya de estudio. Con el objetivo de seleccionar la

variedad de chirimoya apropiada para su investigación e industrialización, se evaluaron las características fisicoquímicas presente en 4 frutos de chirimoya para cada variedad, tal y como se detalla en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4
Evaluación de las características fisicoquímicas como parámetros de elección de la variedad apropiada de chirimoya

Evaluación	Parámetros de selección	Método
Análisis fisicoquímico	Rendimiento del fruto	Descrito por Fonseca *et al*.
	Contenido total de polifenoles	Folin Ciocalteu
	Acidez titulable	AOAC 942.15 Ed 19
	Sólidos solubles totales	AOAC 932.12 Ed 19
	*p*H	AOAC 981.12 Ed 19

Fuente: Adaptado de Alique (1995); Pentzke (2006); Kumhar, Pareek & Ameta (2014); Fonseca, Rodríguez, Herrera y Fisher (2012).

3.5.2.1. Rendimiento del fruto.

Con el objetivo de determinar los porcentajes de cáscara, semillas y pulpa, se realizó pesadas mediante el uso de una balanza de mesa con cada una de las partes mencionadas del fruto, con ello se obtuvo el rendimiento del fruto para cada variedad (Fonseca *et al.*, 2012).

3.5.2.2. Contenido total de polifenoles.

El contenido total de polifenoles se determinó aplicando el método de Folin Ciocalteu basado en la descripción de García, Fernández y Fuentes (2015) con algunas modificaciones.

- *Preparación de la curva patrón con ácido gálico.*

Se preparó 10 ml de una solución madre o concentrada (2500 ppm) de ácido gálico, luego se realizó las siguientes diluciones: 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm y 2000 ppm a partir de solución madre preparada. Para ello se utilizó viales de 10 ml, donde cada disolución con determinada concentración contiene 1 ml del patrón.

- *Preparación del extracto de polifenoles en la muestra de pulpa.*

Para cada muestra se pesó aproximadamente 2,5 g de pulpa de chirimoya y se añadió 5 ml de etanol puro (relación 1:2), posteriormente todo el contenido se homogeneizó mediante agitación constante durante 2 min. Finalmente se filtró el contenido con tela de organza recuperando el líquido sobrenadante el cual contiene los compuestos polifenólico presente en la pulpa de chirimoya.

- *Determinación de polifenoles en la muestra y en los patrones de ácido gálico.*

En cada vial se añadió 3,9 ml de agua destilada, luego se le agregó 50 µL de la extracción de los compuestos polifenólicos o de cada disolución patrón de ácido gálico.

Posteriormente a ello, se añadió 250 µL del reactivo Folin Ciocalteu, dejando reposar todo el contenido durante 8 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se le adicionó 750 µL de una solución de Na_2CO_3 al 7,5% dejándolo reposar durante 2,5 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente la lectura del contenido total de polifenoles se cuantificó midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

3.5.2.3. Acidez titulable.

Para determinar la acidez titulable presente en la pulpa de chirimoya se utilizó el método descrito por la AOAC 941.15, previamente pesando 3,5 g de muestra en un vaso precipitado de 100 ml y luego se llevó a un volumen aproximado de 80 ml con agua desionizada o destilada, se colocó toda la disolución en un matraz de 250 ml donde se mezcló correctamente dando inicio a la titulación.

Para la determinación de la acidez titulable se llenó una bureta con al menos 45 ml de la solución estandarizada de NaOH 0,1N. Se montó la bureta en el soporte universal con la pinza doble correspondiente. Se añadió 0,2 ml de indicador fenolftaleína (3 gotas). Con la muestra en agitación, se tituló rápidamente hasta observar un tono rosado persistente (30 s). Se reportó el gasto de NaOH para el cálculo de la acidez titulable, expresando el resultado de acidez como porcentaje en ácido cítrico, dado que es el ácido orgánico más relevante en la chirimoya (Alique, 1995; Tejerina, 2017).

El cálculo del % acidez titulable para la pulpa de chirimoya se determinó mediante:

$$\%\ \text{Acidez titulable} = \frac{V \times C \times f \times 100\%}{C_{[NaOH]} \times \text{masa muestra}}$$

Donde:

V : Volumen de gasto de la solución de NaOH estandarizada (ml).

C : Concentración de la solución de NaOH estandarizada (N).

f : Factor de equivalencia de 1 ml de NaOH 0,1 N a ácido cítrico. Se usó un factor de 0,006404 (mEq-g).

3.5.2.4. Sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles totales se determinaron siguiendo la metodología descrito por Robledo (2007) con ciertos cambios en base a la metodología AOAC 932.12. Para ello se pesó aproximadamente 5 g de pulpa de chirimoya diluyendo en 5 ml de agua destilada, luego se homogeneizó con ayuda de una bagueta durante 10 s, se filtró el contenido de la mezcla con tela de organza recuperando el líquido filtrado para luego centrifugar a 2000 rpm por 20 min. Con el líquido sobrenadante obtenido se extrajo una gota colocándolo en el refractómetro (0 - 30%), reportando como resultados los sólidos solubles totales expresados en °Brix luego de haber multiplicado por el factor de dilución.

3.5.2.5. pH.

El *p*H fue medido con ayuda de un *p*Hmetro portátil (Pentzke, 2006). Se determinó a partir del método AOAC 981.12, para lo cual se pesó 4 g de pulpa diluida en agua destilada, donde la temperatura del producto de prueba debe ser igual a la temperatura de la solución buffer usada para la estandarización, se enjuagó y secó los electrodos para seguidamente sumergirlos en el producto de prueba y leer el *p*H, dejando que el medidor se estabilice durante un minuto, finalmente se enjuagó y secó los electrodos.

3.5.3. Caracterización fisicoquímica de la chirimoya.

La variedad de chirimoya elegida como la más apropiada para su estudio y comercialización en la etapa anterior, es proveniente del anexo La Merced de Chaute, distrito San Bartolomé, provincia Huarochirí, región Lima ubicado a 2491 msnm. En la Tabla 5 se muestran los parámetros a evaluar en la caracterización fisicoquímica del fruto.

Tabla 5
Parámetros a evaluar en la caracterización fisicoquímica de la chirimoya

Caracterización	Parámetros	Método
Características físicas	Peso	Descrito por Fonseca *et al.*
	Tamaño	Descrito por Fonseca *et al.*
	Volumen	Descrito por Fonseca *et al.*
Análisis proximal	Determinación de humedad	AOAC 4.1.06
	Determinación de proteínas	AOAC 2011.11
	Determinación de lípidos	AOAC 31.4.02
	Determinación de fibra cruda	AOAC 997.08
	Determinación de ceniza	AOAC 923.03
	Determinación de carbohidratos	AOAC 29.026

Fuente: Adaptado de Fonseca *et al.* (2012); Robledo (2007); Sucapuca (2013)

Se seleccionaron cinco frutos de chirimoya sin defectos aparentes y libres de enfermedades, provenientes, las cuales fueron sometidos a las siguientes evaluaciones.

3.5.3.1. Características físicas.

- *Peso.*

El peso se registró utilizando una balanza de mesa (Fonseca *et al*., 2012).

- *Tamaño.*

Para la determinación del tamaño, se tomó en cuenta el largo (medido desde el pedúnculo hasta la base del fruto) y el diámetro de las chirimoyas, se utilizó una cámara digital Canon SX610HS y el software Image J para el proceso de las imágenes (Fonseca *et al*., 2012).

- *Volumen.*

Para determinar el volumen del fruto se midió la cantidad de agua desplazada por cada fruto empleando un vaso graduado de 2 L (Fonseca *et al*., 2012).

3.5.3.2. Análisis proximal.

- *Determinación de humedad.*

Se colocó aproximadamente 5 g de pulpa en una placa petri registrando el peso exacto de la muestra húmeda inicial y la placa completamente limpia y seca. Luego se colocó la muestra en una cámara de secado a temperatura de 70° C durante 48 h hasta obtener un peso constante. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar las muestras en el desecador hasta el momento de su pesado. Finalmente, se calculó el porcentaje de humedad en peso usando la siguiente fórmula (Nielsen, 2003).

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100\%$$

- *Determinación de cenizas.*

El porcentaje de cenizas se determinó siguiendo la metodología descrita por Vergaray (2018). Se registró el peso del crisol previamente limpio y seco, luego se anotó nuevamente el peso del crisol después de haber añadido 1,5 g de pulpa de chirimoya libre de humedad. El crisol con la muestra se llevó a la mufla a 500° C durante 5 h. Se retiró y colocó inmediatamente la muestra al desecador hasta su enfriamiento. Por último se tomó el peso del crisol con la cenizas obtenido. La cenizas se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso del crisol} + \text{muestra} - \text{Peso del crisol}} \times 100\%$$

- *Determinación de proteínas, grasa y fibra cruda.*

La determinación de proteínas, grasa y fibra cruda en la caracterización fisicoquímica de la chirimoya se mandaron analizar en los laboratorios de la Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C. (SAT). Dichos resultados se adjuntan en el Anexo 33.

- *Determinación de carbohidratos.*

Se obtuvo por diferencia del 100% con la suma de proteína, grasa, ceniza, fibra cruda y humedad (Sucapuca, 2013).

$$\%\ \text{Carbohidratos} = 100\% - (\%\text{Cenizas} + \%\text{Proteínas} + \%\text{Humedad} + \%\text{Grasa} + \%\text{Fibra})$$

3.5.4. Evaluación de la actividad sinérgica en la pulpa de chirimoya.

Para cada tratamiento establecido por el diseño experimental del proyecto de investigación (Ver Tabla 6) se evaluó los cambios fisicoquímicos que se producen en la pulpa

de chirimoya durante 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 días de almacenamiento a -20° C con el objetivo de determinar si existe algún efecto sinérgico entre el quitosano y el ácido cítrico, el cual logre prolongar significativamente el retraso del pardeamiento enzimático producidos en la pulpa de chirimoya logrando una mayor vida útil del producto. Hough y Fiszman (2005) mencionan que el tiempo en el cual un alimento o producto se encuentra apto para el consumo humano debido a las adecuadas características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas aceptables, se conoce como vida útil. Los parámetros fisicoquímicos cuantificadores de la variable "vida útil" en la pulpa de chirimoya se detallan en la Tabla 7.

Tabla 6

Concentraciones (%) para cada tratamiento añadidos a la pulpa de chirimoya

Tratamiento	**Concentración expresada en % p/p**	
	Quitosano	**Ácido cítrico**
T1 (Control)	0,00	0,00
T2	0,00	3,00
T3	0,75	0,00
T4	0,75	3,00

Tabla 7

Evaluación fisicoquímica como parámetros de calidad en la pulpa de chirimoya para la determinación de la actividad sinérgica

Evaluación fisicoquímico	**Parámetros de calidad**	**Método**
Análisis fisicoquímico	Actividad de la polifenoloxidasa	Espectrofotométrico
	Contenido de polifenoles totales	Folin Ciocalteu
	Color	Colorimetría
	Acidez titulable	AOAC 942.15 Ed 19
	Sólidos solubles totales	AOAC 932.12 Ed 19
	*p*H	AOAC 981.12 Ed 19

Fuente: Adaptado de Robledo (2007); Campos *et al*. (2008); Kumhar *et al*. (2014); Pentzke (2006)

3.5.4.1. Acidez titulable.

La acidez titulable presente en la pulpa de chirimoya se determinó replicando el método descrito por la AOAC 941.15.

3.5.4.2. pH.

Se determinó el *p*H de la pulpa mediante el uso de un *p*Hmetro tal como se describe en el método AOAC 981.12.

3.5.4.3. Sólidos solubles totales.

Para la medición de sólidos solubles se empleó el método refractométrico AOAC 932.12 realizando la lectura en un refractómetro digital marca ATC (0-30%).

3.5.4.4. Contenido de polifenoles totales.

El contenido total de polifenoles se determinó mediante el método Folin-Ciocalteau, siendo los resultados expresados en mg de ácido gálico/100 g muestra fresca.

3.5.4.5. Actividad de la polifenoloxidasa.

La actividad de la polifenoloxidasa (PPO) se determinó mediante la velocidad de formación de orto−quinonas a 25° C, generando un incremento en la absorbancia a 400 nm utilizando pirocatecol como sustrato (Casado, 2004; Erat, Sakiroglu & Kufrevioglu, 2005; Bravo, Muñoz, Calderón y Osorio, 2011). Las evaluaciones se realizaron por duplicado.

- *Extracción de la enzima PPO.*

La extracción de la polifenoloxidasa se obtuvo utilizando el método propuesto por García, Giraldo, Hurtado y Mendivil (2006) con algunas modificaciones. Para ello se pesó 2,5 g de pulpa, y se homogeneizó con 10 ml de buffer McIlvaine (*p*H 7,0) durante 30 s, luego se filtró desechando el residuo sólido, finalmente la solución filtrada se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, siendo el líquido sobrenadante el extracto que contiene la enzima polifenoloxidasa.

- *Medición de la actividad enzimática (PPO).*

Se determinó en base a la metodología planteada por Bravo *et al*. (2011) con ciertas modificaciones. Se utilizó como sustrato al pirocatecol, en una cubeta se añadió 2,5 ml de pirocatecol a 0,01 M (sustrato) y 100 µL del extracto enzimático. Como blanco se tomó 2,5 ml de pirocatecol y 100 µL del buffer McIlvaine (*p*H 7,0). Se hicieron lecturas de la absorbancia a 400 nm cada 10 s durante un tiempo de 2 min en un espectrofotómetro UV - Vis. Una unidad de la enzima polifenoloxidasa, se define como la cantidad de extracto enzimático que causa un aumento en la absorbancia de 0,001 unidades por min.

3.5.4.6. Color.

La variación del color (ΔE) producido en la pulpa de chirimoya durante los 120 días de almacenamiento se registró utilizando el sistema CIE-lab, donde se midió los parámetros L*, a* y b*. El parámetro L* nos muestran valores de luminosidad u oscuridad, mientras que el parámetro a* nos indica la variación del color rojo - verde, siendo positivo ($+a$) para el rojo y negativo ($-a$) para el color verde y los valores del parámetro b nos explica la variación del color amarillo - azul, donde valores positivos ($+b$) indica el color amarillo y valores negativos el color azul (López y Di Sarli, 2016). La variación del color (ΔE) se obtuvo luego de aplicar la siguiente fórmula especificada en la norma europea EN 12878:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Donde:

ΔE : Variación del color.

ΔL^2 : Diferencia de luminosidad (más claro o más oscuro).

Δa^2 : Diferencia de coordenada a* (más rojo o más verde).

Δb^2 : Diferencia de coordenada b* (más amarillo o más azul).

3.5.5. Análisis microbiológico de la pulpa de chirimoya.

La evaluación microbiológica se realizó a la pulpa de chirimoya que logró obtener una mayor conservación luego de los 120 días de almacenamiento de acuerdo a los resultados de la evaluación sinérgica entre el quitosano y ácido cítrico. Para el análisis microbiológico se consultó la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N°071 MINSA/DIGESA - V.01., 2003), donde se menciona que para frutas y hortalizas frescas semiprocesadas o de IV Gama, ya sea refrigeradas y/o congeladas se deben realizar los análisis microbiológicos teniendo en cuenta los agentes microbianos detallados en la Tabla 8.

Tabla 8

Criterios microbiológico en la evaluación de la pulpa de chirimoya

Evaluación microbiológico	Criterio microbiológico
Análisis microbiológico	*Aerobios mesófilos* *Escherichia coli* *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes*

Fuente: Adaptado a partir de la NTS N°071 MINSA/DIGESA - V.01. (2003)

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Selección de la variedad de chirimoya.

Tabla 9

Variables del diseño experimental en la selección de la variedad de chirimoya

Variable independiente	Variable dependiente	Variable respuesta
Variedad (Lisa, Impressa, Umbonata)	Características fisicoquímicas	Rendimiento del fruto Contenido total de polifenoles *p*H Acidez titulable Sólidos solubles totales

3.5. Método de análisis

3.5.1. Caracterización del quitosano obtenido.

La caracterización del quitosano obtenido se realizó en base a la metodología planteada por Castro (2017).

3.5.1.1. Humedad y cenizas.

- *Humedad.*

Se lavó y secó completamente una placa petri, luego se pesó aproximadamente 1,5 g de quitosano registrando el peso exacto de la muestra y la placa. Luego fue llevado a estufa durante 48 h a 70° C obteniendo un peso constante. La muestra se retiró de la estufa y se colocó en un desecador hasta su enfriamiento a temperatura ambiente. Finalmente se registró el peso final calculando de esta manera el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso muestra de quitosano}} \times 100\%$$

Donde:

Peso inicial : Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano (g).
Peso final : Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano seco (g).

- *Cenizas.*

Para la determinación del porcentaje de cenizas primero se lavó y secó completamente un crisol el cual se registró su peso. Luego se añadió aproximadamente 1,5 g de muestra seca de quitosano donde también se anotó su peso exacto. El crisol con la muestra se llevó a una mufla durante 5 h a 500° C, pasado el tiempo se retiró hacia un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Finalmente se registró el peso del crisol con la muestras de cenizas de quitosano. Mediante la siguiente fórmula se obtuvo el contenido de cenizas:

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100\%$$

3.5.1.2. Viscosidad y peso molecular.

- *Viscosidad.*

- Preparación de soluciones:

Se preparó 500 ml de solución buffer (0,2 M en ácido acético y 0,1 M en acetato de sodio), luego con la muestra de quitosano se preparó una solución patrón (Q1) pesando 0,6 g de quitosano (peso exacto) disuelto en 100 ml de la solución buffer, se dejó agitando durante 24 h para lograr su completa disolución. Pasado el tiempo de agitación, se realizaron 4

diluciones a la mitad de la concentración cada una, a partir de la solución de quitosano patrón (Q1) obteniendo las siguientes disoluciones Q 1/2, Q 1/4, Q 1/8 y Q 1/16.

- Procedimiento:

En un baño maría a 30° C se introdujo el viscosímetro de Ostwald donde se midió por cuadruplicado el tiempo de flujo al trasvasar 10 ml de las siguientes soluciones: agua destilada, buffer, Q 1/16, Q 1/8, Q1/4 y Q1/2 (se trabajó en ese orden). Antes de cada medida se dejó calentar durante 5 min cada solución. Finalmente se halló la densidad de cada solución preparada con el uso de un picnómetro de 50 ml.

- Cálculos:

Con los datos obtenidos se calculó el tiempo promedio (t_p) y densidad (ρ) para cada una de las soluciones preparadas. La viscosidad (η) de las soluciones se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\eta = B \times \rho \times t$$

Donde:

η : Viscosidad de la solución.
ρ : Densidad de la solución.
t : Tiempo de flujo de la solución.
B : Constante del viscosímetro.

La constante del viscosímetro (B) se calculó mediante los datos de la densidad y viscosidad del agua a 30° C (según tablas termodinámicas).

La viscosidad intrínseca de la muestra de quitosano se determinó mediante el punto de intersección de las gráficas Ln (η_r /C vs C y η_e /C vs C cuando la concentración es igual a cero (C = 0). Los cálculos respectivos para hallar η_r y η_e se detalla en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3
Nomenclatura y fórmula viscosimétrica

Símbolo	Nombre	Unidades
η	Viscosidad de la solución	P (poise) o Pa.s
η_s	Viscosidad del solvente	P (poise) o Pa.s
$\eta_r = \eta/\eta_s$	Viscosidad relativa	Sin unidades
$\eta_e = \eta_r - 1$	Viscosidad específica	Sin unidades
Ln (η_r /C)	Viscosidad inherente	ml/g
η_e /C	Viscosidad reducida	ml/g
[η]	Viscosidad intrínseca	ml/g

Fuente: Castro (2017)

- *Peso molecular.*

Mediante la ecuación de Mark-Houwink se determinó el peso molecular del quitosano expresado en kDa, luego de conocer los valores de la viscosidad intrínseca y el grado de desacetilación de dicho polímero.

$$[\eta] = K(\overline{M})^{\alpha}$$

Donde:

η : Viscosidad intrínseca (ml/g).

K, α : Constantes que varían según el grado de desacetilación del polímero.

$\overline{M}$: Peso molecular (kDa).

Mediante la siguientes ecuaciones se halló los valores de las constante K y α en función del porcentaje del grado de desacetilación.

$$K = 1{,}64 \times 10^{-30} \times (\%GD)^{14}$$

$$\alpha = 1{,}82 - 1{,}02 \times 10^{-2} \times (\%GD)$$

Donde:

%GD : Es el porcentaje del grado de desacetilación del quitosano.

K : Constante característico del polímero/disolvente (ml/g).

3.5.1.3. Grado de desacetilación.

- *Grado de desacetilación por espectroscopía infrarroja.*

Se mezcló aproximadamente 2 mg de muestra de quitosano con 98 mg de KBr hasta conseguir una mezcla homogénea. Luego se formó una pastilla manteniendo la mezcla en el pastillador durante 30 min, por último, se colocó la pastilla formada en el equipo IR. Mediante el software del equipo se obtuvo el espectro de la muestra, reportando las absorbancias para la frecuencia de 1320 cm^{-1} y 1420 cm^{-1}. El grado de desacetilación se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \ GD = 87{,}8 - 31{,}92 \frac{A_{1320}}{A_{1420}}$$

- *Grado de desacetilación por espectroscopía de UV - primera derivada.*

- Preparación de las disoluciones

Se preparó y valoró 100 ml de una solución de ácido acético a 1 M con NaOH de concentración conocida (1 M). Luego se diluyó esta solución en una fiola de 100 ml, obteniendo 0,1 M de ácido acético. Se pesó 2,5 mg de quitosano (peso exacto) y se disolvió en 2,5 ml de ácido acético 0,1 M, finalmente se enrasa a 25 ml con agua destilada.

- Análisis de la muestra

Se obtuvo el espectro en la absorbancia de la primera derivada para el rango de 190 y 240 nm, para ello se utilizó como blanco agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de la primera derivada a la longitud de 202,5 nm.

- Cálculos

Se empleó la curva de calibración confeccionada por Castro (2017) en su libro "Investigación aplicada con quitina y quitosano", cuya ecuación matemática determina la concentración del N−acetil−glucosamina (NAG) en ppm, obteniendo de esta manera el % N acetilo. La concentración de quitosano (ppm) se calculó del peso registrado anteriormente, diluido en 25 ml de agua destilada. Finalmente el % de desacetilación del quitosano se determinó de las siguientes fórmulas:

$$\%\text{N acetilo} = \frac{[\text{NAG}]}{[\text{Quitosano}]} \times 100\%$$

$$\%\ \text{Desacetilación} = 100\% - \%\ \text{N acetilo}$$

3.5.2. Selección de la variedad de chirimoya.

El departamento de Inteligencia de Mercados, apoyado por el Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX) y la Bioversity International reconocen cinco variedades de chirimoya clasificadas, según el tipo de exocarpo, en Laevis (Lisa), Impressa, Umbonata, Tuberculata y Mamillata. Solo tres de estas variedades (Lisa, Impressa y Umbonata) se cultivan en el anexo La Merced de Chaute ubicado en la provincia Huarochirí, región Lima lugar donde procede la chirimoya de estudio. Con el objetivo de seleccionar la variedad de chirimoya apropiada para su investigación e industrialización, se evaluaron las características fisicoquímicas presente en 4 frutos de chirimoya para cada variedad, tal y como se detalla en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Evaluación de las características fisicoquímicas como parámetros de elección de la variedad apropiada de chirimoya

Evaluación	Parámetros de selección	Método
Análisis fisicoquímico	Rendimiento del fruto	Descrito por Fonseca *et al.*
	Contenido total de polifenoles	Folin Ciocalteu
	Acidez titulable	AOAC 942.15 Ed 19
	Sólidos solubles totales	AOAC 932.12 Ed 19
	*p*H	AOAC 981.12 Ed 19

Fuente: Adaptado de Alique (1995); Pentzke (2006); Kumhar, Pareek & Ameta (2014); Fonseca, Rodríguez, Herrera y Fisher (2012).

3.5.2.1. Rendimiento del fruto.

Con el fin de determinar la proporción de cáscara, semillas y pulpa se separaron las tres partes mencionadas y se pesaron en una balanza de mesa obteniendo el porcentaje de pepa, cáscara y pulpa para cada variedad (Fonseca *et al.*, 2012).

3.5.2.2. Contenido total de polifenoles.

El contenido total de polifenoles se determinó aplicando el método de Folin Ciocalteu basado en la descripción de García, Fernández y Fuentes (2015) con algunas modificaciones.

- *Preparación de la curva patrón con ácido gálico.*

Se preparó 10 ml de una solución madre o concentrada (2500 ppm) de ácido gálico, luego se realizó las siguientes diluciones: 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm y 2000 ppm a partir de solución madre preparada. Para ello se utilizó viales de 10 ml, donde cada disolución con determinada concentración contiene 1 ml del patrón.

- *Preparación del extracto de polifenoles en la muestra de pulpa.*

Para cada muestra se pesó aproximadamente 2,5 g de pulpa de chirimoya y se añadió 5 ml de etanol puro (relación 1:2), posteriormente todo el contenido se homogeneizó mediante agitación constante durante 2 min. Finalmente se filtró el contenido con tela de organza recuperando el líquido sobrenadante el cual contiene los compuestos polifenólico presente en la pulpa de chirimoya.

- *Determinación de polifenoles en la muestra y en los patrones de ácido gálico.*

En cada vial se añadió 3,9 ml de agua destilada, luego se le agregó 50 µL de la extracción de los compuestos polifenólicos o de cada disolución patrón de ácido gálico. Posteriormente a ello, se añadió 250 µL del reactivo Folin Ciocalteu, dejando reposar todo el contenido durante 8 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se le adicionó 750 µL de una solución de Na_2CO_3 al 7,5% dejándolo reposar durante 2,5 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente la lectura del contenido total de polifenoles se cuantificó midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

3.5.2.3. Acidez titulable.

Para determinar la acidez titulable presente en la pulpa de chirimoya se utilizó el método descrito por la AOAC 941.15, previamente pesando 3,5 g de muestra en un vaso precipitado de 100 ml y luego se llevó a un volumen aproximado de 80 ml con agua desionizada o destilada, se colocó toda la disolución en un matraz de 250 ml donde se mezcló correctamente dando inicio a la titulación.

Para la determinación de la acidez titulable se llenó una bureta con al menos 45 ml de la solución estandarizada de NaOH 0,1N. Se montó la bureta en el soporte universal con la pinza doble correspondiente. Se añadió 0,2 ml de indicador fenolftaleína (3 gotas). Con la

muestra en agitación, se tituló rápidamente hasta observar un tono rosado persistente (30 s). Se reportó el gasto de NaOH para el cálculo de la acidez titulable, expresando el resultado de acidez como porcentaje en ácido cítrico, dado que es el ácido orgánico más relevante en la chirimoya (Alique, 1995; Tejerina, 2017).

El cálculo del % acidez titulable para la pulpa de chirimoya se determinó mediante:

$$\% \text{ Acidez titulable} = \frac{V \times C \times f \times 100\%}{C_{[NaOH]} \times \text{masa muestra}}$$

Donde:

V : Volumen de gasto de la solución de NaOH estandarizada (ml).

C : Concentración de la solución de NaOH estandarizada (N).

f : Factor de equivalencia de 1 ml de NaOH 0,1 N a ácido cítrico. Se usó un factor de 0,006404 (mEq-g).

3.5.2.4. Sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles totales se determinaron siguiendo la metodología descrito por Robledo (2007) con ciertos cambios en base a la metodología AOAC 932.12. Para ello se pesó aproximadamente 5 g de pulpa de chirimoya diluyendo en 5 ml de agua destilada, luego se homogeneizó con ayuda de una bagueta durante 10 s, se filtró el contenido de la mezcla con tela de organza recuperando el líquido filtrado para luego centrifugar a 2000 rpm por 20 min. Con el líquido sobrenadante obtenido se extrajo una gota colocándolo en el refractómetro (0 - 30%), reportando como resultados los sólidos solubles totales expresados en °Brix luego de haber multiplicado por el factor de dilución.

3.5.2.5. pH.

El *p*H fue medido con ayuda de un *p*Hmetro portátil (Pentzke, 2006). Se determinó a partir del método AOAC 981.12, para lo cual se pesó 4 g de pulpa diluida en agua destilada, donde la temperatura del producto de prueba debe ser igual a la temperatura de la solución buffer usada para la estandarización, se enjuagó y secó los electrodos para seguidamente sumergirlos en el producto de prueba y leer el *p*H, dejando que el medidor se estabilice durante un minuto, finalmente se enjuagó y secó los electrodos.

3.5.3. Caracterización fisicoquímica de la chirimoya.

La variedad de chirimoya elegida como la más apropiada para su estudio y comercialización en la etapa anterior, es proveniente del anexo La Merced de Chaute, distrito San Bartolomé, provincia Huarochirí, región Lima ubicado a 2491 msnm. En la Tabla 5 se muestran los parámetros a evaluar en la caracterización fisicoquímica del fruto.

Tabla 5
Parámetros a evaluar en la caracterización fisicoquímica de la chirimoya

Caracterización	Parámetros	Método
Características físicas	Peso	Descrito por Fonseca *et al.*
	Tamaño	Descrito por Fonseca *et al.*
	Volumen	Descrito por Fonseca *et al.*
Análisis proximal	Determinación de humedad	AOAC 4.1.06
	Determinación de proteínas	AOAC 2011.11
	Determinación de lípidos	AOAC 31.4.02
	Determinación de fibra cruda	AOAC 997.08
	Determinación de ceniza	AOAC 923.03
	Determinación de carbohidratos	AOAC 29.026

Fuente: Adaptado de Fonseca *et al.* (2012); Robledo (2007); Sucapuca (2013)

Se seleccionaron cinco frutos de chirimoya sin defectos aparentes y libres de enfermedades, provenientes, las cuales fueron sometidos a las siguientes evaluaciones.

3.5.3.1. Características físicas.

- *Peso.*

El peso se registró utilizando una balanza de mesa (Fonseca *et al*., 2012).

- *Tamaño.*

Para la determinación del tamaño, se tomó en cuenta el largo (medido desde el pedúnculo hasta la base del fruto) y el diámetro de las chirimoyas, se utilizó una cámara digital Canon SX610HS y el software Image J para el proceso de las imágenes (Fonseca *et al*., 2012).

- *Volumen.*

Para determinar el volumen del fruto se midió la cantidad de agua desplazada por cada fruto empleando un vaso graduado de 2 L (Fonseca *et al*., 2012).

3.5.3.2. Análisis proximal.

- *Determinación de humedad.*

Se colocó aproximadamente 5 g de pulpa en una placa petri registrando el peso exacto de la muestra húmeda inicial y la placa completamente limpia y seca. Luego se colocó la muestra en una cámara de secado a temperatura de 70° C durante 48 h hasta obtener un peso constante. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar las muestras en el desecador hasta el momento de su pesado. Finalmente, se calculó el porcentaje de humedad en peso usando la siguiente fórmula (Nielsen, 2003).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100\%$$

- *Determinación de cenizas.*

El porcentaje de cenizas se determinó siguiendo la metodología descrita por Vergaray (2018). Se registró el peso del crisol previamente limpio y seco, luego se anotó nuevamente el peso del crisol después de haber añadido 1,5 g de pulpa de chirimoya libre de humedad. El crisol con la muestra se llevó a la mufla a 500° C durante 5 h. Se retiró y colocó inmediatamente la muestra al desecador hasta su enfriamiento. Por último se tomó el peso del crisol con la cenizas obtenido. La cenizas se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso del crisol} + \text{muestra} - \text{Peso del crisol}} \times 100\%$$

- *Determinación de proteínas, grasa y fibra cruda.*

La determinación de proteínas, grasa y fibra cruda en la caracterización fisicoquímica de la chirimoya se mandaron analizar en los laboratorios de la Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C. (SAT). Dichos resultados se adjuntan en el Anexo 33.

- *Determinación de carbohidratos.*

Se obtuvo por diferencia del 100% con la suma de proteína, grasa, ceniza, fibra cruda y humedad (Sucapuca, 2013).

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (\%\text{Cenizas} + \%\text{Proteínas} + \%\text{Humedad} + \%\text{Grasa} + \%\text{Fibra})$$

3.5.4. Evaluación de la actividad sinérgica en la pulpa de chirimoya.

Para cada tratamiento establecido por el diseño experimental del proyecto de investigación (Ver Tabla 6) se evaluó los cambios fisicoquímicos que se producen en la pulpa de chirimoya durante 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 días de almacenamiento a -20° C con el objetivo de determinar si existe algún efecto sinérgico entre el quitosano y el ácido cítrico, el cual logre prolongar significativamente el tiempo de vida útil de la pulpa de chirimoya mediante el control de su pardeamiento enzimático. Hough y Fiszman (2005) mencionan que la vida útil de un alimento representa aquel período de tiempo durante el cual el alimento se conserva apto para el consumo desde el punto de vista sanitario, manteniendo las características sensoriales, fisicoquímicas, funcionales y nutricionales por encima de los límites de calidad previamente establecidos como aceptables. Los parámetros fisicoquímicos cuantificadores de la variable "vida útil" en la pulpa de chirimoya se detallan en la Tabla 7.

Tabla 6

Concentraciones (%) para cada tratamiento añadidos a la pulpa de chirimoya

Tratamiento	**Concentración expresada en % p/p**	
	Quitosano	**Ácido cítrico**
T1 (Control)	0,00	0,00
T2	0,00	3,00
T3	0,75	0,00
T4	0,75	3,00

Tabla 7

Evaluación fisicoquímica como parámetros de calidad en la pulpa de chirimoya para la determinación de la actividad sinérgica

Evaluación fisicoquímico	**Parámetros de calidad**	**Método**
Análisis fisicoquímico	Actividad de la polifenoloxidasa	Espectrofotométrico
	Contenido de polifenoles totales	Folin Ciocalteu
	Color	Colorimetría
	Acidez titulable	AOAC 942.15 Ed 19
	Sólidos solubles totales	AOAC 932.12 Ed 19
	*p*H	AOAC 981.12 Ed 19

Fuente: Adaptado de Robledo (2007); Campos *et al*. (2008); Kumhar *et al*. (2014); Pentzke (2006)

3.5.4.1. Acidez titulable.

La acidez titulable presente en la pulpa de chirimoya se determinó replicando el método descrito por la AOAC 941.15.

3.5.4.2. pH.

Se determinó el *p*H de la pulpa mediante el uso de un *p*Hmetro tal como se describe en el método AOAC 981.12.

3.5.4.3. Sólidos solubles totales.

Para la medición de sólidos solubles se empleó el método refractométrico AOAC 932.12 realizando la lectura en un refractómetro digital marca ATC (0-30%).

3.5.4.4. Contenido de polifenoles totales.

El contenido total de polifenoles se determinó mediante el método Folin-Ciocalteau, siendo los resultados expresados en mg de ácido gálico/100 g muestra fresca.

3.5.4.5. Actividad de la polifenoloxidasa.

La actividad de la polifenoloxidasa (PPO) se logró determinar mediante la velocidad de formación de orto−quinonas a 25° C, lo que genera un incremento en la absorbancia a 400 nm utilizando pirocatecol como sustrato (Casado, 2004; Erat, Sakiroglu & Kufrevioglu, 2005; Bravo, Muñoz, Calderón y Osorio, 2011). Las evaluaciones se realizaron por duplicado.

- *Extracción de la enzima PPO.*

La extracción de la polifenoloxidasa se obtuvo utilizando el método propuesto por García, Giraldo, Hurtado y Mendivil (2006) con algunas modificaciones. Para ello se pesó 2,5 g de pulpa, y se homogeneizó con 10 ml de buffer McIlvaine (*p*H 7,0) durante 30 s, luego se filtró desechando el residuo sólido, finalmente la solución filtrada se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, siendo el líquido sobrenadante el extracto que contiene la enzima polifenoloxidasa.

- *Medición de la actividad enzimática (PPO).*

Se determinó en base a la metodología planteada por Bravo *et al*. (2011) con ciertas modificaciones. Se utilizó como sustrato al pirocatecol, en una cubeta se añadió 2,5 ml de pirocatecol a 0,01 M (sustrato) y 100 µL del extracto enzimático. Como blanco se tomó 2,5 ml de pirocatecol y 100 µL del buffer McIlvaine (*p*H 7,0). Se hicieron lecturas de la absorbancia a 400 nm cada 10 s durante un tiempo de 2 min en un espectrofotómetro UV - Vis. Una unidad de la enzima polifenoloxidasa, se define como la cantidad de extracto enzimático que causa un aumento en la absorbancia de 0,001 unidades por min.

3.5.4.6. Color.

La variación del color (ΔE) producido en la pulpa de chirimoya durante los 120 días de almacenamiento se registró utilizando el sistema CIE-lab, donde se midió los parámetros L*, a* y b*. El parámetro L* nos muestran valores de luminosidad u oscuridad, mientras que el parámetro a* nos indica la variación del color rojo - verde, siendo positivo ($+a$) para el rojo y negativo ($-a$) para el color verde y los valores del parámetro b nos explica la variación del color amarillo - azul, donde valores positivos ($+b$) indica el color amarillo y valores negativos el color azul (López y Di Sarli, 2016). La variación del color (ΔE) se obtuvo luego de aplicar la siguiente fórmula especificada en la norma europea EN 12878:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Donde:

ΔE : Variación del color.

ΔL^2 : Diferencia de luminosidad (más claro o más oscuro).

Δa^2 : Diferencia de coordenada a* (más rojo o más verde).

Δb^2 : Diferencia de coordenada b* (más amarillo o más azul).

3.5.5. Análisis microbiológico de la pulpa de chirimoya.

La evaluación microbiológica se realizó a la pulpa de chirimoya que logró obtener una mayor conservación luego de los 120 días de almacenamiento de acuerdo a los resultados de la evaluación sinérgica entre el quitosano y ácido cítrico. Para el análisis microbiológico se consultó la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N°071 MINSA/DIGESA - V.01., 2003), donde se menciona que para frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas), refrigeradas y/o congeladas se deben realizar los análisis microbiológicos teniendo en cuenta los agentes microbianos detallados en la Tabla 8.

Tabla 8
Criterios microbiológico en la evaluación de la pulpa de chirimoya

Evaluación microbiológico	Criterio microbiológico
Análisis microbiológico	*Aerobios mesófilos* *Escherichia coli* *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes*

Fuente: Adaptado a partir de la NTS N°071 MINSA/DIGESA - V.01. (2003)

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Selección de la variedad de chirimoya.

Tabla 9
Variables del diseño experimental en la selección de la variedad de chirimoya

Variable independiente	Variable dependiente	Variable respuesta
Variedad (Lisa, Impressa, Umbonata)	Características fisicoquímicas	Rendimiento del fruto Contenido total de polifenoles *p*H Acidez titulable Sólidos solubles totales

Con la finalidad de seleccionar la variedad de chirimoya que presente características fisicoquímicas apropiadas para su estudio, se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual nos proporciona un análisis de cada variedad (Lisa, Impresa y Umbonata) cultivada y cosechada en el pueblo anexo La Merced de Chaute en Huarochirí. Se optó por este diseño debido al interés de estudio que es solo el efecto que produce las diferentes variedades (tratamientos) en las características fisicoquímicas que presentan para su

comercialización y conservación, sin incluir otro factor de variabilidad que podría intervenir en los resultados, las variables del diseño experimental se observan en la Tabla 9.

Debido al efecto significativo obtenido a partir de las variedades de chirimoya estudiadas, se procedió a realizar comparaciones entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Las observaciones Y_{ij} se podrán describir con el modelo estadístico lineal dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Es la observación de la variable de estudio.

μ : Media global.

τ_i : Parámetro que mide el efecto de las diferentes variedades de chirimoya.

ε_{ij} : Error experimental.

3.6.2. Evaluación de la actividad sinérgica en la pulpa de chirimoya.

Tabla 10

Variables del diseño experimental en la evaluación de la actividad sinérgica

Variable independiente	Variable dependiente	Variable respuesta
Quitosano (0,00%; 0,75%) Ácido cítrico (0,00%; 3%)	Pardeamiento de la pulpa de chirimoya	Actividad de la polifenoloxidasa Contenido total de fenoles Color *p*H Acidez titulable Sólidos solubles totales

Debido a que se tiene como objetivo evaluar el posible efecto sinérgico que existe entre el quitosano (factor con 2 niveles) con el ácido cítrico (factor con 2 niveles), por lo que la interacción de ambos factores es de interés para prolongar el tiempo de conservación de la pulpa de chirimoya, teniendo en cuenta que el tiempo de almacenamiento también influye en la disminución de las características sensoriales y calidad de los alimentos, por tanto, este tiempo de almacenamiento será el factor bloque debido a no ser el interés de estudio, siendo así el diseño experimental, que más se ajuste, el diseño de bloque completamente al azar (DBCA) con un arreglo factorial 2x2, obteniendo un total de 4 tratamientos (T_1= Control o blanco, T_2= 3,00% AC, T_3= 0,75% CS y T_4= 0,75% CS + 3,00% AC); donde, en cada tratamiento se consideraron 3 repeticiones en las evaluaciones de las variables respuesta, a excepción de la actividad de la PPO, la cual se realizó las evaluaciones por duplicado, las variables del diseño experimental se observan en la Tabla 10.

El modelo estadístico de efectos para este tipo de diseño está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + Bloq_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} : Es la observación de la variable de estudio.

μ : Es la media global.

α_i : Parámetro que mide el efecto producido por el quitosano.

β_j : Parámetro que mide el efecto producido por el ácido cítrico.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Parámetro que mide el efecto de la interacción de ambos tratamientos.

$Bloq_k$: Efecto de los días (factor de bloqueo).

ε_{ijk} : Error experimental.

3.7. Análisis de la información

Durante el proceso de evaluación de la actividad sinérgica se recopilaron cada uno de los datos al menos por duplicado y fueron mostrados como el promedio ± la desviación estándar empleando Hoja de Cálculo de Google Drive. Para el tratamiento estadístico en la selección de la variedad de chirimoya se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), en tanto para la evaluación de la actividad sinérgica presente en la pulpa de chirimoya, el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con un arreglo factorial 2x2, cuyos datos fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2019 realizando el análisis de varianza de los factores (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05 aplicando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si hay diferencia significativa entre los tratamientos evaluados.

En los análisis espectrofotométricos, contenido de polifenoles y actividad de la enzima polifenoloxidasa, se empleó el software VisionPro™, mientras que para la caracterización del quitosano el software OMNIC™ Specta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Caracterización del quitosano obtenido

4.1.1. Caracterización del quitosano.

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos al caracterizar el biopolímero tomando en cuenta su porcentaje de humedad, contenido de cenizas, viscosidad, peso molecular y el grado de desacetilación, debido a la importancia de los grupos aminas presente en la estructura química del quitosano.

Tabla 11
Caracterización del quitosano obtenido a partir de la pluma de pota

Humedad (%)	Cenizas (%)	Viscosidad intrínseca (mL/g)	Peso molecular (kDa)	Grado de desacetilación (%)
10,52	0,35	602	846	78,2

Experimentalmente se determinó un valor de 0,35% de cenizas para el quitosano extraído de la quitina presente en la pluma de pota, siendo este un resultado muy bajo a comparación de los reportados por Castro y Vidal (2015), quienes obtuvieron un porcentaje de cenizas de 16,29% para el quitosano obtenido del muy muy (*Emerita analoga*), Hernández, Águila, Flores, Viveros y Ramos (2009) registraron 1,4% de cenizas para el quitosano de camarón, De la Paz *et al*., (2012) evaluaron los procesos de obtención del quitosano de langosta a diferentes escalas, determinando valores de 0,73%, 0,80% y 0,68% de cenizas para la escala banco, piloto e industrial respectivamente. Además, obtuvieron el valor del porcentaje de cenizas para muestras de quitosanos comerciales (caparazón de cangrejo) importados de Sigma - Aldrich chemistry (USA), donde se reportó 0,48% y 0,61% de cenizas para el quitosano de alto peso molecular (79% grado de desacetilación) y mediano peso molecular (81% grado desacetilación) respectivamente.

Rodríguez, Valderrama, Alarcón y López (2010) afirman que el contenido de cenizas de una determinada muestra, representa la cantidad de elementos inorgánicos que contiene. Siendo este parámetro, un indicador muy relevante para la aplicación de quitosano en diferentes áreas como la biomedicina y alimentos, donde se requiere por lo general un bajo porcentaje de material inorgánico (Espinoza, 2007; Pastor, 2004).

Posiblemente el bajo contenido de cenizas se deba a las características y cualidades que presenta la quitina obtenida a partir del cartílago (pluma) del calamar gigante o pota, cuya fuente carece de material calcáreo y se ubica en el interior del cefalópodo, por lo que no se lleva a cabo una bioacumulación directa de metales inorgánicos como el plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), Zinc (Zn) y Níquel (Ni) a diferencia de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de moluscos y crustáceos, donde la exposición con estos metales pesados, producto de la contaminación del mar peruano, ocurre

de forma directa logrando obtener porcentajes de cenizas elevadas (>1%), generando un gran impacto a la salud debido a su alta toxicidad de estos materiales inorgánicos (Castro, 2017; Reyes, Vergara, Torres y González, 2016). El bajo contenido de cenizas hallado experimentalmente probablemente también se deba al proceso de purificación que se realizó al quitosano logrando remover, en esta etapa, los minerales e impurezas, obteniendo un biopolímero de menor material insoluble e inorgánico (Castro, 2017).

Niquette *et al*. (2004), Mármol (2003) y Lárez (2006) describen al quitosano como un biopolímero catiónico lineal, biodegradable, no tóxico, de alto peso molecular y de fácil aplicación, el cual se obtiene mediante la desacetilación parcial de la quitina sustituyendo sus grupos acetamida ($R-NH-CO-CH_3$) por grupos amina ($R-NH_2$). La disposición de estos grupos aminas del quitosano son el principal responsable de la capacidad antioxidante y antimicrobiana, reacción con enzimas, formación de películas, agente quelante entre otras, teniendo su aplicación en la medicina, alimentos, agricultura, biotecnología, cosmética, tratamientos de aguas, etc (Lárez 2003). Debido a la baja exposición de los metales inorgánicos con la quitina (cartílago) del calamar gigante, se puede lograr omitir el proceso de desmineralización, resultando ser ventajosa la producción de quitosano cuando se utiliza la pluma de pota (residuo hidrobiológico) como fuente de obtención (Valenzuela, 2006).

El contenido de humedad determinado fue de 10,52%, cuyo valor es similar en comparación con el resultado reportado por Hernández *et al*. (2009), hallando 10,48% de humedad para el quitosano extraído del exoesqueleto de camarón. Sin embargo, el valor experimental hallado es menor al resultado determinado por Martínez, Díaz y Ramírez (2019), pero mayor a lo registrado por Barra, Romero y Beltramino (2012) obteniendo 14% y 9% de humedad para los quitosanos extraídos a partir de la quitina del camarón y langostino respectivamente. Los diferentes contenidos de humedad que presenta los compuestos de quitosano principalmente se genera por las distintas fuentes de materias primas de obtención y a los procesos físicos o de reacción bruscos al cual se somete la quitina durante el proceso de desacetilación, disminuyendo su contenido de agua, logrando finalmente obtener polímeros con diferentes propiedades y características (Lárez, 2003; Espinoza, 2007). La desacetilación parcial de la quitina presente en la pluma de pota se logró mediante una reacción termo-alcalina, utilizando NaOH concentrado, durante este proceso ocurre una liberación de los grupos acetilo de la quitina y un aumento de grupos libres de aminas el cual genera una mayor probabilidad de absorción de agua, debido a la formación de puentes de hidrógeno con los radicales libres de grupos hidroxilo ($-OH$) presente en la estructura química del quitosano (De la Paz *et al*., 2012; Hernández *et al*., 2009).

Anand, Kalaivani, Muruthupandy, Kumaraguru & Suresh (2014), Khan, Peh & Ch'ng (2002) y De la Paz *et al*. (2012) afirman que a causa de la característica estructural del quitosano como su porosidad y la formación de espacios cristalinos y amorfos, produce una mayor facilidad en la absorción del contenido de agua. Por lo tanto, este biopolímero posee naturaleza higroscópica, donde el contenido de humedad de estos productos de quitosano

oscilan por debajo del 10%. Por ello, luego del proceso de secado, el quitosano obtenido se almacenó en un recipiente completamente hermético quedando protegido de la humedad.

La aplicación de la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) resulta eficaz en la determinación cualitativa de compuestos orgánicos e inorgánicos a partir del reconocimiento de grupos funcionales que forma parte de la estructura química de un determinado compuesto (Skoog, Holler y Crouch, 2008). Por tal motivo, es considerada uno de los métodos más utilizados debido a su simplicidad en la obtención de resultados (Valenzuela, 2006). Por ello, se optó en utilizar la técnica espectroscópica (FTIR) en la determinación del porcentaje del grado de desacetilación como parte de la caracterización del quitosano, para ello se realizó el análisis en el espectrofotómetro infrarrojo de la pastilla formada a partir de la mezcla de la muestra (quitosano seco) con bromuro de potasio (KBr) .

El espectro infrarrojo (IR) obtenido para la muestra de quitosano se detalla en la Figura 46 (Anexo 7), cuyos picos de absorción, provocado por la vibración molecular de los grupos funcionales del biopolímero, coincide con las bandas de absorción de los espectros IR reportados por Escobar, Castro & Vergara (2013), Anand *et al*. (2014), Khan *et al*. (2002), y Blanquicet, Flores de Hoyos, González, Meza y Rodríguez (2015) para las muestras de quitosanos comerciales extraídas a partir de la quitina del caparazón de crustáceos, squilla mantis, cangrejo y camarón respectivamente.

Las bandas de absorción que se obtuvieron luego de la interacción entre la energía producida por el espectro infrarrojo y la muestra de quitosano fueron de 3414, 2889, 1433, 1632, 1382, 1321, 1255 y 1083 cm^{-1}.

El pico de absorbancia generado en 3414 cm^{-1} se produce a consecuencia de la vibración por tensión molecular de los grupos hidroxilo libres ($-OH$) y por el estiramiento de los grupos amida (NH) presentes en la cadena del biopolímero, siendo considerados estos grupos funcionales los más característico para el compuesto de quitosano, el cual induce una banda de absorción alrededor de 3430 cm^{-1} (Escobar *et al*., 2013; Balanta, Grande y Zuluaga, 2010; De la Paz *et al.*, 2012). Sin embargo para Anand *et al*. (2014) la vibración provocada alrededor de 3427 cm^{-1} menciona que es debido a la presencia conjunta de los grupos hidroxilo y amino (NH_2) del quitosano.

Hernández *et al*. (2009) y Anand *et al*. (2014) señalan que la banda producida a frecuencias cercanas a 2892 cm^{-1} son provocados por el grupo $C-H$, por lo que de la Figura 48 se puede deducir que el pico de absorbancia en 2889 cm^{-1} es ocasionado por la presencia de dicho grupo. Mientras que para Balanta *et al*. (2010) la banda formada alrededor de 1255 cm^{-1} se origina por el estiramiento asimétrico del enlace $C-O$.

Por otro lado, los picos de absorción que se observan en 1632 y 1382 se debe a la vibración de alargamiento simétrico de los grupos carbonilo ($C=O$) y por la presencia de los grupos metilo (CH_3), los cuales forman parte de la estructura química del grupo acetilo del quitosano. Mientras que la banda provocada en 1083 cm^{-1} se debe principalmente por el alargamiento del enlace glucosídico ($C-O-C$) que unen a los anillos piranósicos del

biopolímero (Ramírez, Delgado y Andrade, 2016; Escobar *et al*., 2013; Anand *et al*., 2014; De la Paz *et al*., 2012; Balanta, *et al*., 2010; Hernández *et al*., 2009).

El pico formado alrededor de 1321 y 1433 cm^{-1} se le atribuye a la vibración de flexión del enlace C−N presente en el grupo amida y amina respectivamente, las cuales son utilizadas como bandas de medición logrando determinar en el cálculo del porcentaje del grado de desacetilación debido a la posibilidad de hallar la relación que existe entre la cantidad de N-glucosamina y N-acetilglucosamina en el quitosano (Ramírez *et al*., 2016; Castro, 2017; Brugnerotto *et al*., 2001).

Aplicando la técnica de espectroscopía FTIR se logró determinar experimentalmente 78,2% del grado de desacetilación para el quitosano obtenido a partir de la pluma de pota, cuyo valor se encuentra por debajo a lo reportado por Valenzuela (2006) y Moreno, Alfaro, Guzmán, Rimaycuna y Cruz (2016), quienes obtuvieron 85,4% y 85,47% del grado de desacetilación respectivamente, para el quitosano proveniente de la misma fuente de obtención (pluma de pota). Probablemente esta diferencia comparado con nuestros resultados, se deba al cálculo de las áreas debajo de las bandas de absorción en 1321 y 1433 cm^{-1}, las cuales se tomaron como referencia siguiendo la metodología propuesta por Castro (2017), ya que estas mediciones se encuentran sujetas, en cierto grado, a la percepción por parte del analista sobre el espectro IR al indicar el inicio y término del pico de absorbancia y a la selección de la línea base (Valenzuela, 2006). También se le puede atribuir esta diferencia al criterio tomado por diferentes autores como referencia para la banda de absorción para la amina u otro grupo funcional utilizado diferentes ecuaciones para el cálculo del %GD. Por ejemplo, Khan *et al*. (2002) y Valenzuela (2006) emplearon las bandas de referencia en 1650 y 3450 cm^{-1} para el grupo amida I (grupo acetilo) y el grupo hidroxilo (−OH) respectivamente mientras que Brugnerotto *et al*. (2001) por su parte utilizan las bandas de 3350 y 1320 cm^{-1} las cuales relacionan la fracción unitaria de la cantidad de monómeros de N-acetilglucosamina. Moreno *et al*. (2016) a diferencia de los otros autores anteriormente citados, aplicaron el método de titulación potenciométrica para obtener el %GD para el quitosano extraído a partir de la pluma de pota.

Por otro lado, Valenzuela (2006) menciona que el grado de desacetilación obtenido mediante una reacción termoalcalina puede variar dependiendo las condiciones de temperatura y tiempo de reacción, así como de la concentración de hidróxido (NaOH) el cual se emplea. Es por ello que posiblemente esta diferencia del GD para el quitosano proveniente de una misma fuente se deba por las distintas condiciones de operación y obtención que se aplicó a comparación a los empleados por Moreno *et al*. (2016) y Valenzuela (2006).

Sin embargo, el porcentaje de desacetilación hallado (78,2%) resulta ser mayor comparado con quitosanos obtenidos a partir de diferentes residuos hidrobiológicos, Hernández *et al*. (2009) obtuvo como resultado 64% de la desacetilación parcial para el quitosano extraído del exoesqueleto del camarón, Anand *et al*. (2014) reportaron 68% y 73% del GD para quitosanos derivada de la quitina del exoesqueleto del cangrejo y squilla mantis

respectivamente, Ramírez *et al*. (2016) por su parte obtuvieron un grado de desacetilación del 74,8% para una muestra de quitosano comercial de mediano peso molecular utilizando el método espectrofotométrico FTIR.

A pesar de los diferentes criterios y métodos asumidos por varios autores, la obtención del grado de desacetilación como parte de la caracterización del quitosano es una propiedad determinante en la clasificación del polímero como quitina o quitosano, siendo considerado como quitina si presenta un valor menor del 50% del grado de desacetilación (Castro, 2017; Valenzuela (2006). Por los resultados obtenidos (78,2% del GD) y los grupos funcionales reconocidos en el espectro IR podemos concluir que el biopolímero obtenido a partir de la pluma de pota es clasificado como quitosano.

Diferentes investigaciones realizados por Fuentes y Pastor (2009), Valenzuela (2006), Cabrel (2018), García (2013) y Nakamatsu (2012) indican que el quitosano obtenido a partir de la pluma de pota, presenta una estructura química ordenada del tipo beta (β), otorgándole ciertas propiedades importantes en la aplicación de alimentos, como la formación de soluciones muy transparentes con un bajo contenido de material insoluble y cenizas.

Cabrel (2018) y Peniche, Arguelles, Gallardo, Elvira y San Román (2001) señalan que el reconocimiento de las tres formas polimórficas que presenta el quitosano (α, β, γ) se logra mediante los difracción de rayos X, donde el $\beta-$quitosano se caracteriza por la disposición ordenada y paralela de sus cadenas monoméricas que a diferencia del $\alpha-$quitosano y $\gamma-$quitosano, estas presentan una configuración antiparalela y una alteración de sentidos cada dos cadenas monoméricas respectivamente. Sin embargo, este tipo de enlace glucosídico que presenta el $\beta-$quitosano, hace de este compuesto un polímero semejante a la celulosa el cual no es asimilable por el sistema digestivo del hombre. Esto ocurre por carecer de enzimas que logren romper el enlace teniendo un valor nulo en la nutrición humana (Porto, 2019).

Otra evaluación muy recurrente en la caracterización del quitosano es la determinación de su peso molecular, cuyo valor según Rabea *et al*. (2003) puede definir sus propiedades funcionales, fisicoquímicas y fisiológicas. Experimentalmente se obtuvo un peso molecular de 846 kDa para el quitosano extraído a partir de la pluma de pota. Este resultado es menor comparado a lo obtenido por Moreno *et al*. (2016), quienes determinaron un peso molecular de 1055 kDa del quitosano proveniente de la misma materia prima. La variación de pesos moleculares para una misma fuente de extracción inicial, se debe a la influencia de la temperatura, tiempo, concentración del hidróxido y las condiciones de trabajo durante el proceso de desacetilación de la quitina (Wu, 1988). Sin embargo, el valor experimental resulta mayor a los obtenido de otras fuentes de extracción, como los casos que reportan Parada, Crespín, Miranda y Katime (2004), Rodríguez *et al*. (2010) y Dima, Sequeiros y Zaritzky (2013) determinando pesos moleculares de 622 kDa, 816 kDa y 239 kDa para los quitosanos extraídos a partir del camarón, caparazón de cangrejo y langostino respectivamente. Esto posiblemente por la influencia de la naturaleza de la fuente de materia prima el cual se extrae la quitina (Wu, 1988).

Kumar (2000) afirma que la viscosidad en polímeros es una de las propiedades más importantes debido a las diferentes aplicaciones que recibe al formar soluciones viscosas. Por este motivo, se determinó la viscosidad intrínseca como parte de la caracterización del biopolímero, obteniendo un valor de 602 mL/g, siendo menor a la viscosidad intrínseca obtenido por Moreno *et al*. (2016) pero mayor a lo reportado por Rodríguez *et al*. (2010), consiguiendo valores de 937 y 442 mL/g para muestras de quitosano obtenido del calamar gigante y camarón respectivamente. Para Kumar (2000) las propiedades viscoelásticas que brinda las soluciones de quitosano y la solubilidad del polímero se ven influenciadas por su peso molecular. Hernández *et al*. (2009) por su parte, señala que el peso molecular del quitosano nos informa la longitud de las cadenas que constituyen el biopolímero, por lo que un mayor peso molecular provocan una disminución en la solubilidad a causa del probable entrecruzamiento entre estas cadenas. Por lo mencionado, dejaría en claro la diferente viscosidad obtenida experimentalmente comparado a lo obtenido por las misma o diferente materia prima de extracción, además del uso de ácido cítrico para su completa disolución.

4.2. Selección de la variedad de chirimoya

4.2.1. Rendimiento del fruto.

En la Tabla 12 se indica los distintos rendimientos (en porcentaje) para las diferentes variedades de chirimoya. Siendo la variedad Lisa, la de menor rendimiento en cáscara (26,31%) y pepa (3,10%) a diferencia de las otras dos variedades (Impresa y Umbonata). Sin embargo, el rendimiento en pulpa de la variedad Lisa fue de 70,07%, resultado mayor a comparación de la variedad Impresa (63,74%) y Umbonata (66,37%). Brito y Rodríguez (2008) reportaron para el fruto de chirimoya variedad Lisa 20% de cáscara y 73% en pulpa, concluyendo de esta manera que la variedad Lisa es la que mayor cantidad de pulpa presenta a comparación de las variedades Impresa y Umbonata. Autores como Gonzáles y Cornejo (2014) evaluaron ecotipos de chirimoya en Huánuco, con tipos de exocarpo lisa, depresiones suaves (Impresa) y protuberancias pequeñas (Umbonata), presentando un rendimiento en pepa o semilla entre 1,25% a 3,39%; 2,09% a 5,75% y 5,85% a 8,05% respectivamente.

Tabla 12
Valores promedio del rendimiento de cáscara, pepa y pulpa para las tres variedades de chirimoya

Variedad	Rendimiento de cáscara (%)	Rendimiento de pepa (%)	Rendimiento de pulpa (%)
Lisa	$26,31^{A} \pm 1,33$	$3,10^{A} \pm 0,22$	$70,07^{A} \pm 2,01$
Impresa	$28,65^{B} \pm 0,77$	$7,16^{C} \pm 0,41$	$63,74^{B} \pm 2,96$
Umbonata	$29,23^{B} \pm 1,34$	$6,26^{B} \pm 0,49$	$66,37^{AB} \pm 2,23$

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$) donde los valores luego del signo ± indican la desviación estándar. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Fuertes y Gavilánez (2012) afirman que mediante el pesado se puede conocer el rendimiento de un determinado fruto, siendo este un indicador de calidad que se emplea debido al porcentaje de merma que se logra obtener de la fruta suministrada. Es por ello, que para cada variedad se calculó el rendimiento del fruto (cáscara, semilla y pulpa) teniendo en cuenta el cuidado especial al momento de su cosecha, transporte y procesado, ya que según Gonzáles (2015) el rendimiento industrial de la chirimoya depende de la calidad postcosecha.

En la Tabla 13 se aprecia los resultados del análisis de varianza obtenidos a partir de los valores en rendimiento de cáscara, pepa y pulpa, con el objeto de determinar si existe diferencia significativa entre las tres variedades de chirimoya. Los rendimientos de cáscara, pepa y pulpa muestran un $p = 0,015$; $p < 0,0001$ y $p = 0,0157$; al ser estos valores menores al nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) se deduce que, en cada evaluación de rendimiento, existe una diferencia entre las variedades; en otras palabras, al menos una se diferencia significativamente. Por ende, en las evaluaciones de rendimiento, se continuó el análisis estadístico realizando la prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre las variedades.

Tabla 13

Cuadro ANOVA del rendimiento de cáscara, pepa y pulpa en las tres variedades de chirimoya estudiadas

Rendimiento	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Cáscara	Modelo	19,11	2	9,55	6,86	0,0155
	Variedad	19,11	2	9,55	6,86	0,0155
	Error	12,53	9	1,39		
	Total	31,63	11			
Pepa	Modelo	36,45	2	18,23	120,87	< 0,0001
	Variedad	36,45	2	18,23	120,87	< 0,0001
	Error	1,36	9	0,15		
	Total	37,81	11			
Pulpa	Modelo	80,95	2	40,47	6,83	0,0157
	Variedad	80,95	2	40,47	6,83	0,0157
	Error	53,33	9	5,93		
	Total	134,27	11			

En la Figura 22 se muestran las comparaciones, respecto al rendimiento de cáscara, pepa y pulpa entre las variedades de chirimoya estudiadas según la prueba de Tukey. Para el rendimiento de cáscara se obtiene una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la variedad Lisa respecto a las otras dos variedades (Impresa y Umbonata), mientras que entre ambas no existe dicha diferencia. En el rendimiento de pepa se obtiene una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las tres variedades (Lisa, Impresa y Umbonata), donde la diferencia resulta ser más notoria entre la variedad Lisa respecto a las variedades Umbonata e Impresa. Por último, para

el rendimiento de pulpa se obtiene una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las variedades Lisa e Impresa, en tanto la variedad Umbonata no presenta una diferencia marcada con ninguna de las dos variedades antes mencionadas.

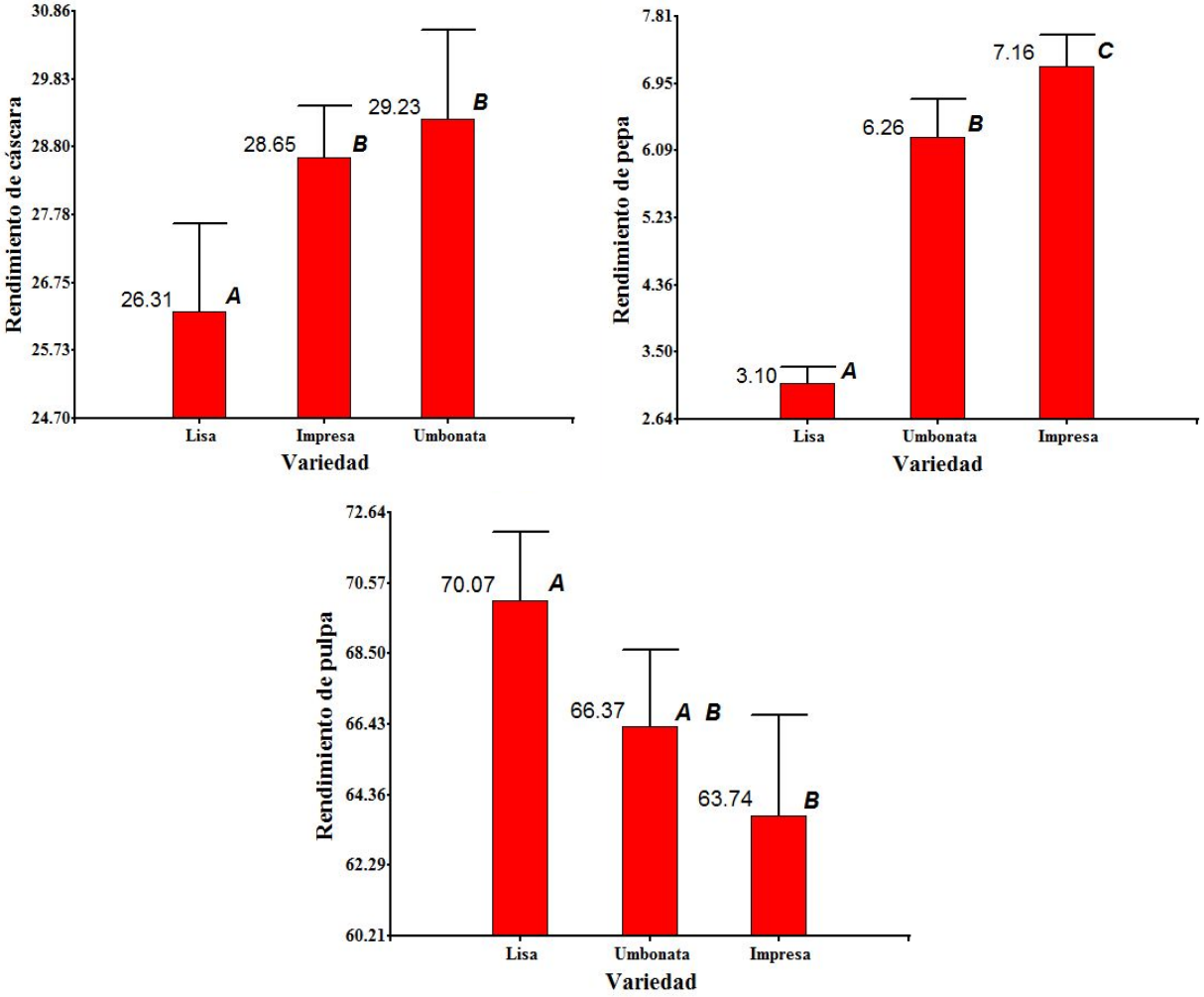


Figura 22. Comparación del rendimiento de cáscara, rendimiento de pepa y rendimiento de pulpa en las tres variedades de chirimoya, según la prueba de Tukey.

De los diferentes análisis estadísticos, se deduce que la chirimoya variedad Lisa es apropiada para procesar a nivel industrial, esto debido a los resultados en rendimiento de cáscara, pepa y pulpa, siendo notorio el mayor aprovechamiento de la fruta a comparación de las dos variedades restantes.

4.2.2. Acidez titulable y *p*H.

La Tabla 14 muestra los valores promedios de acidez titulable y *p*H para las chirimoyas de variedad Lisa, Impresa y Umbonata. González (2013) manifiesta que el fruto de chirimoya posee altos atributos sensoriales y nutricionales, generando cierto interés a nivel nacional como internacional su conservación, industrialización y exportación. Sin embargo, existen algunas dificultades en el manejo y procesamiento industrial de la chirimoya, limitando su uso en la industria de las frutas debido a su elevada sensibilidad a los daños mecánicos y al

pardeamiento producido en su pulpa (Van Damme y Scheldeman, 1999b). De igual manera, Gonzáles y Cornejo (2014) afirman que existe poco conocimiento sobre la diversidad de ecotipos, la forma de los frutos, color y tipo del exocarpo, tamaño, peso del fruto, color de la pulpa, contenido de SST, *p*H, oxidación, número de semillas, entre otros, limitando las opciones para un adecuado manejo de la producción de este cultivo.

Tabla 14

Valores promedio de la de acidez titulable y pH para las tres variedades de chirimoya

Variedad	**Acidez titulable (mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra fresca)**	***p*H**
Lisa	$0,30^{A} \pm 0,010$	$4,56^{A} \pm 0,025$
Impresa	$0,28^{B} \pm 0,006$	$4,70^{B} \pm 0,043$
Umbonata	$0,31^{A} \pm 0,015$	$4,52^{A} \pm 0,029$

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$) donde los valores luego del signo ± indican la desviación estándar. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

En el caso de la acidez, los resultados obtenidos se expresan en mEq-g de ácido cítrico/100 g de pulpa fresca, por ser uno de los dos ácidos orgánicos predominante en la fruta (Tejerina, 2017). La variedad Impresa registró el menor valor del contenido de acidez con 0,28 mEq-g de ácido cítrico/100 g de peso en la pulpa fresca, a diferencia de las variedades Lisa y Umbonata con 0,30 y 0,31 mEq-g ácido cítrico/100 g de muestra fresca respectivamente. Resultados similares en la acidez de la chirimoya fueron reportados por otros autores. Balboa (2011) obtuvo 0,37 de acidez expresado en % de ácido cítrico para la pulpa de chirimoya. Brito y Rodríguez (2008) por su parte registraron 0,33% ácido cítrico para su acidez titulable en la caracterización fisicoquímica de la chirimoya variedad Lisa mejorada (Ecuador).

Respecto a los resultados obtenidos para el *p*H, las variedades Lisa y Umbonata presentaron valores de 4,56 y 4,52 respectivamente mientras que la variedad Impresa reportó un mayor valor de *p*H con 4,70. Comparando estos resultados obtenidos con el de la acidez titulable, se puede observar la interdependencia que existe entre ambos parámetros fisicoquímicos, de tal forma que al disminuir el *p*H, mayor es la acidez que se registra. Esto principalmente se origina por la relación que tienen con el contenido de ácidos orgánicos presente en la fruta (Nisar *et al*., 2015; Farfán, 2018).

Autores como Brito y Rodríguez (2008) reportaron un valor de *p*H igual a 4,64 para pulpa de chirimoya, variedad lisa mejorada (Ecuador), mientras Guevara (1990) reportó un *p*H de 4,1 a 4,5 para pulpa de chirimoya, variedad Lisa ecotipo Cumbe (Perú). Siendo estos resultados muy similares a lo obtenido para las tres variedades de chirimoya estudiada.

Tejerina (2017) y Undurraga, Olaeta y Mac (1998) señalan que la chirimoya, a diferencia de muchos otros frutos, muestra un aumento del contenido de ácidos orgánicos durante el periodo de maduración generando su sabor característico, siendo los ácidos málico y cítrico

los predominantes y principales causantes de la acidez en la fruta. Según Nisar, Baba & Ahmad (2015) y Nielsen (2010), la acidez y el *p*H son valores interdependientes, de tal forma que al disminuir el *p*H, mayor es la acidez que se registra. A pesar de que ambos resultados se obtienen de forma diferente, cada parámetro fisicoquímico origina su propio impacto en la calidad de las frutas, existiendo un rango específico de *p*H y acidez en el que los consumidores prefieren. Por tal motivo, seleccionar una determinada variedad para su comercialización en función al valor de su acidez y *p*H se vuelve un parámetro relevante debido a que el contenido de acidez junto al dulzor y los diferentes compuestos volátiles que presenta la chirimoya forma parte de los elementos fundamentales generadores de su sabor (Kader, 2008; Pangborn, 1963).

Mediante el análisis de varianza, se puede afirmar con un 95% de confianza el efecto significativo producido por las variedades de chirimoya respecto al contenido de acidez titulable (p = 0,0027) y al valor de *p*H (p = 0,0001) tal y como se señala en la Tabla 15.

Tabla 15
Cuadro ANOVA de la acidez titulable y pH en las tres variedades de chirimoya estudiadas

Análisis	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Acidez titulable	Modelo	2,9 E-03	2	1,4 E-03	12,21	0.0027
	Variedad	2,9 E-03	2	1,4 E-03	12,21	0,0027
	Error	1,1 E-03	9	1,2 E-04		
	Total	3,9 E-03	11			
*p*H	Modelo	0,07	2	0,03	31,67	0.0001
	Variedad	0,07	2	0,03	31,67	0,0001
	Error	0,01	9	1,1 E-03		
	Total	0,08	11			

La Figura 23 nos muestra la comparación mediante la prueba de Tukey entre las tres variedades de chirimoya, resultando haber una diferencia significativa entre la variedad Lisa y Umbonata respecto a la Impresa para ambos resultados.

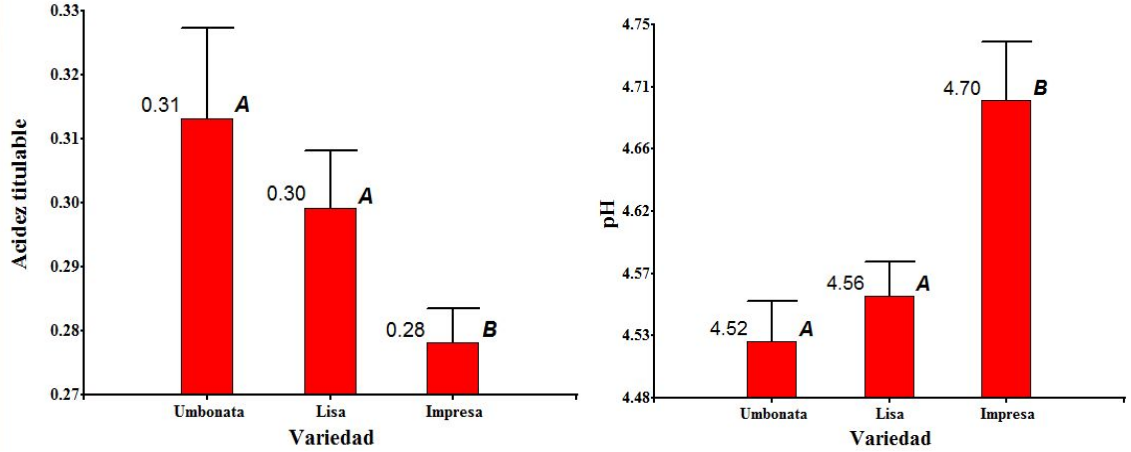


Figura 23. Comparación de la acidez titulable y *p*H según la prueba de Tukey.

En la selección de la variedad de chirimoya apropiada para su estudio y conservación se tomará en cuenta el valor de la acidez titulable y *p*H debido a la importancia en los alimentos, principalmente por su influencia en el sabor, color, estabilidad microbiana e indicador de calidad (Nielsen, 2010).

Farfán (2018) afirma que el *p*H se encuentra relacionado con la capacidad de proliferación microbiana puesto que a valores bajos permitirán una vida de anaquel más amplia, ya que actuará, en el fruto, como barrera fisiológica natural frente a la acción microbiana. Sin embargo, hay frutos como el melón (*p*H de 6,2 a 6,5); la chirimoya u otras anonas, cuyo *p*H es mayor a 4,4 (Doyle, Beuchat y Montville, 2001) lo cual podría significar una notoria desventaja en la conservación del fruto. Además, el principal problema de la pulpa de chirimoya es su pardeamiento u oxidación causado por la enzima polifenoloxidasa, cuyo *p*H óptimo para su desarrollo oscila de 5,0 a 5,5 (Kobashigawa, 2018; Palma, Aguilera & Stanley, 1993).

Finalmente, considerando los criterios anteriormente mencionados, las variedades Lisa y Umbonata serían las más adecuadas debido al menor valor de *p*H registrado. Además se debe tener en cuenta que se añadirá como acidulante el ácido cítrico a la pulpa en la evaluación de su actividad sinérgica con el quitosano, provocando el aumento de su acidez y una mayor disminución del valor *p*H.

4.2.3. Sólidos solubles totales.

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos, valores promediados, del análisis de sólidos solubles en las tres variedades de chirimoya. De modo que la variedad Lisa, Impresa y Umbonata obtuvieron 19,80; 17,70 y 19,85 °Brix respectivamente.

Tabla 16
Valores promedio del contenido de °Brix para las tres variedades de chirimoya

Variedades	°Brix
Lisa	$19,80^{A} \pm 0,43$
Impresa	$17,70^{B} \pm 0,20$
Umbonata	$19,85^{A} \pm 0,19$

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$).
Valores luego del signo ± indican la desviación estándar.
Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

El contenido de sólidos solubles totales fue utilizado como un indicador de calidad, que a su vez ayudó a seleccionar la variedad de chirimoya a ser estudiada en las siguientes etapas de investigación. Autores como Brito y Rodríguez (2008) reportaron un valor de 21,06 °Brix para pulpa de chirimoya, variedad Lisa (Ecuador), mientras Guevara (1990) reportó un valor entre 22 a 25 °Brix para pulpa de chirimoya, variedad Lisa ecotipo Cumbe (Perú). Por otro lado, Gonzáles y Cornejo (2014) evaluaron ecotipos de chirimoya en Huánuco, con tipos de

exocarpo Lisa, depresiones suaves y protuberancias pequeñas, presentando contenidos de azúcares entre 24,8% a 28,2%; 19,8% a 27,8% y 21,8% a 28,3% respectivamente. Al realizar una comparación entre los datos proporcionados por Brito y Rodríguez (2008) y los obtenidos experimentalmente, podemos observar que en la variedad Lisa existe una semejanza. Si bien no existe similitud entre los datos de Gonzáles y Cornejo (2014), se puede concluir que los °Brix ascienden en el orden variedad Impresa, Umbonata y Lisa.

La semejanza de resultados se puede deber a que los sólidos solubles constituyen azúcares, ácidos orgánicos, pectinas solubles, antocianinas y otros compuestos fenólicos, y ácido ascórbico, donde a medida que se incrementa la madurez se incrementa el contenido de azúcares expresados como °Brix (constituido por 80 a 95% de azúcares) (Calderón, 2015; Kader, 2008). Por otro lado, Palma *et al*. (1993) menciona que los sólidos solubles aumentan conforme se incrementa la respiración de la fruta. La tasa de respiración se ve influenciada por la temperatura, si son bajas ralentiza la respiración y reduce la acumulación de sólidos solubles, lo contrario sucede en ambientes cálidos. Además, existe una relación entre la acumulación de azúcares totales y la disminución de los contenidos de almidón, lo que indica una hidrólisis del almidón en sus azúcares constituyentes durante la maduración de la fruta. Por tanto, Sevillano (2007) refiere que hay diferencias de este contenido según la variedad de chirimoya madura, generalmente alcanza un valor entre 18 a 24 °Brix. Mientras InfoAgro (2014) reporta que la mayoría de chirimoyas presentan valores superiores a 20 °Brix.

En la Tabla 17, se muestran los resultados del análisis de varianza obtenidos a partir de los valores de °Brix, donde se puede observar que sí existe una clara diferencia entre los tratamientos ($p < 0,0001$); es decir, al menos uno de las variedades se diferencia significativamente de los otros. Por ende, se continuó el análisis estadístico realizando la prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre las variedades.

Tabla 17
Cuadro ANOVA del °Brix en las tres variedades de chirimoya estudiadas

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadros medios**	**F**	**p-valor**
Modelo	12,05	2	6,02	68,62	< 0,0001
Variedad	12,05	2	6,02	68,62	< 0,0001
Error	0,79	9	0,09		
Total	12,84	11			

En la Figura 24 se muestra las comparaciones, respecto al contenido de °Brix, entre las variedades de chirimoya estudiadas según la prueba de Tukey, obteniendo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la variedad Impresa respecto a las otras dos variedades (Lisa y Umbonata), mientras que entre ambas no existe dicha diferencia significativa.

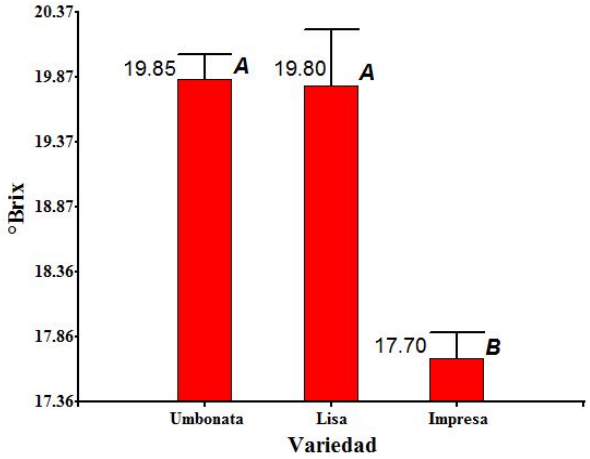


Figura 24. Comparación de los sólidos solubles totales entre las tres variedades de chirimoya, según la prueba de Tukey.

Del análisis estadístico, se deduce que, por poseer la mayor concentración de azúcares, la variedad Lisa o Umbonata serían las más recomendables para trabajar en pulpa debido al sabor dulce característico de una chirimoya con alta calidad.

4.2.4. Contenido de polifenoles totales.

La Tabla 18 muestra los valores promedios obtenidos del contenido de polifenoles totales para cada una de las variedades del fruto chirimoya estudiada, resultando ser la variedad Lisa la que obtuvo menor valor de estos compuestos registrando 218,03 mg ácido gálico/100 g de pulpa fresca, por otro lado la variedad Umbonata e Impressa fueron las que presentaron el mayor contenido de polifenoles con 281,67 y 288,74 mg ácido gálico/100g de muestra fresca respectivamente. Todos estos valores obtenidos se encuentran por encima de lo reportado por Barea (2015), el cual registró 144,3 mg ácido gálico/100 g de peso en fresco de la pulpa de chirimoya; sin embargo menor a los hallado por Vasco *et al*. (2008), obteniendo en su investigación 343 mg ácido gálico/100g de pulpa de chirimoya fresca. Esta diferencia sobre el contenido de polifenoles totales probablemente se deba a la región de procedencia del fruto y a las distintas variedades botánicas que presenta la chirimoya e incluso en el estado fisiológico en el que se procesó (Amiot *et al*., 1992).

Tabla 18

Valores promedio del contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/100 g de pulpa fresca)

Variedad	Contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/100 g de muestra fresca)
Lisa	$218,03^{A} \pm 8,49$
Impresa	$288,74^{B} \pm 5,73$
Umbonata	$281,67^{B} \pm 7,58$

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$) donde los valores luego del signo ± indican la desviación estándar. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Se cuantificó el contenido de polifenoles totales utilizando el ácido gálico como patrón en la curva de calibrado (Anexo 11) donde se interpolan las absorbancias de los extractos etanólicos para la obtención de los resultados, siendo expresados en mg de ácido gálico/100g de pulpa fresca de chirimoya. Vasco, Ruales & Kamal (2008) afirma que el solvente de extracción así como la metodología a emplear puede influir en el contenido de polifenoles, por esta razón, se eligió el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu por su aplicación en la determinación del contenido polifenólico en frutas, por otro lado se utilizó como solvente de extracción al etanol en lugar de metanol, esto debido a la diferencia de polaridad que existe entre estos dos solventes resultando mayor los contenidos de flavonoides, polifenoles y proteínas cuando se emplea etanol (Vit, Santiago y Pérez, 2014).

Para García *et al*. (2015) y Vasco *et al*. (2008) la cantidad de compuestos polifenólicos que presenta un determinado alimento vegetal varía en función de la especie, variedad, clima, parte del vegetal (fruto, semilla, hoja), índice de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento. Con la finalidad de controlar estos factores, se estandarizó las condiciones del pulpeado teniendo en cuenta el índice de madurez para cada variedad (Anexo 36) adicionalmente a ello, el lote de chirimoya recolectado procede de un mismo campo de cultivo ubicado en el anexo La Merced de Chaute a 2491 msnm en la provincia de Huarochirí, siendo transportadas cuidadosamente debido a que la chirimoya es un fruto muy susceptible al pardeamiento originado por algún tipo de daño mecánico (Barea, 2015).

Por otra parte, la investigación realizada por Vasco *et al*.(2008) muestra el contenido polifenólico de diferentes frutas, siendo el de la chirimoya mayor a muchas de estas, como el mango, granadilla, naranjilla, uvilla, maracuyá, entre otros. Concluyendo que la chirimoya al igual que a las diferentes frutas de la familia anona, presentan concentraciones importantes de compuestos polifenólicos a comparación de otras frutas de usual consumo, siendo un parámetro relevante para evaluar su funcionalidad alimenticia debido a su alta capacidad antioxidante reforzando el sistema inmunológico de las personas (López y Granados, 2012; Barea, 2015; López, García, Martínez, Colinas, 2019).

A pesar que estos resultados podrían ser alentadores por su beneficio en la salud de los consumidores, cierto grupo de compuestos polifenólicos están relacionados con el pardeamiento de muchas frutas a causa de su oxidación enzimática, lo cual conlleva a una minuciosa investigación sobre el tipo de compuestos polifenólico que presenta una determinada especie vegetal. Barea (2015) en su investigación doctoral realizó la caracterización del perfil polifenólico de la chirimoya, demostrando concentraciones notables de los derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido cafeico, ácido ferúlico y el ácido cumárico, cuyos compuestos presentan mayor susceptibilidad a la oxidación por parte de la enzima polifenoloxidasa provocando el pardeamiento del fruto (García *et al*, 2015).

La presencia de otros compuestos de carácter fenólico presente en la pulpa de chirimoya como los flavonoides y taninos reportados por Arun, Venkatesh, Chakrapani & Roja (2011) también pueden ser los causante del proceso de pardeamiento, principalmente porque estos

compuestos forman parte de los principales sustratos de la polifenoloxidasa actuando con mayor o menor velocidad dependiendo de su estructura química y a la exposición de estos compuestos con la enzima (Bello, 2000). Por otro lado, Quiñones, Miguel y Aleixandre (2012) y Besada, Novillo, Gil, Navarro y Salvador (2017) también corroboran el efecto que producen los flavonoides y taninos sobre determinadas enzimas provocando su oxidación, lo cual origina cambios fisicoquímicos y metabólicos en las frutas alterando sus características organolépticas debido a la formación de polímeros coloreados indeseables por el consumidor.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas que cumplen diversas funciones fisiológicas siendo en la actualidad de gran interés debido a las diferentes actividades biológicas que desempeñan, sin embargo existe un grupo de polifenoles, como los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, que son oxidados por la polifenoloxidasa, dando lugar al pardeamiento enzimático generando productos comercialmente indeseables de color pardo (García *et al*., 2015). Con el objetivo de seleccionar la variedad de chirimoya apropiada para su estudio, se realizó un análisis detallado sobre el contenido total de polifenoles que presentan y su posible efecto en el pardeamiento enzimático de la pulpa durante su almacenamiento.

Con el fin de evaluar un posible efecto significativo producido por las variedades de chirimoya sobre el contenido de polifenoles se realizó un análisis de varianza. De esta manera se puede afirmar, con el 95% de confianza, una notoria diferencia significativa ($p < 0,0001$) sobre el efecto producido por la variedad respecto a la variación de compuestos polifenólicos, tal y como se señala en la Tabla 19.

Tabla 19
Cuadro ANOVA del contenido de polifenoles totales en las tres variedades de chirimoya estudiadas

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadrados medios**	**F**	**p-valor**
Modelo	12134,67	2	6067,33	112,11	< 0.0001
Variedad	12134,67	2	6067,33	112,11	< 0,0001
Error	487,09	9	54,12		
Total	12621,76	11			

Por tal motivo las tres variedades estudiadas se compararon mediante la prueba de Tukey, resultando existir una diferencia significativa entre la variedad Lisa y las dos variedades restantes (Impresa y Umbonata), no habiendo diferencias significativas entre estas dos últimas (Figura 25).

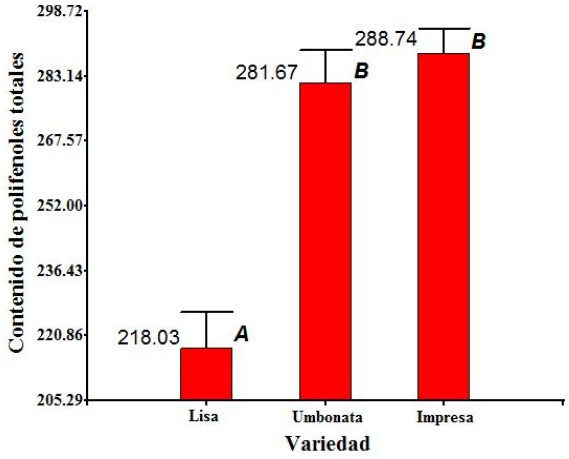


Figura 25. Comparación del contenido de polifenoles para cada variedad según la prueba de Tukey.

Por todo lo mencionado, se puede llegar a la conclusión de que la chirimoya presenta concentraciones considerables de compuestos polifenólicos, las cuales son beneficiosos desde el punto de vista nutricional, sin embargo existe cierto grupos de polifenoles que pueden ser susceptibles a ciertas enzimas provocando su oxidación. Por esta razón se evalúa la opción de seleccionar aquella variedad que presente el menor contenido de polifenoles totales (Lisa) debido a que la chirimoya presenta ciertos grupos de estos compuestos que forman parte del sustrato de la polifenoloxidasa, siendo finalmente un método de control al pardeamiento enzimático (Bello, 2000; Ahvenainen, 1996; Cabezas, 2013).

Según Quiñones *et al*. (2012) el índice de madurez es un factor que puede afectar los valores fisicoquímicos en la pulpa, por esta razón, se determinó este índice en las tres variedades de chirimoya. No existiendo ninguna diferencia significativa en el índice de madurez de la fruta al momento de su análisis, tal como se aprecia en el Anexo 36.

El objetivo que se busca al seleccionar entre las diferentes variedades de chirimoya producidas en la provincia de Huarochirí (Lisa, Impresa y Umbonata) es conseguir la variedad del fruto adecuado, el cual consiga un mayor tiempo de conservación y un alto rendimiento en pulpa, resultando ventajosa su comercialización. Para ello, se debe conocer los diferentes problemas que aqueja la chirimoya, Brito y Rodríguez (2008) afirman que es un fruto climatérico, delicado, de maduración muy rápida y propenso al pardeamiento enzimático, siendo este último un problema serio lo cual genera el poco interés de industrializar el fruto en nuestro país. Gallardo (2003) manifiesta que el pardeamiento enzimático requiere la disponibilidad de ciertos factores esenciales, tales como el oxígeno, cobre (sitio activo de la enzima), enzima y los sustratos apropiados (polifenoles totales). Estos componentes repercuten en la rapidez del pardeamiento de la pulpa, por lo que conocer la naturaleza y el contenido de los compuestos polifenólicos de la chirimoya, además del *p*H donde la enzima pueda disminuir su actividad serían parámetros relevantes para una buena conservación (Mayer, 1986). Además existen factores intrínsecos que intervienen en la velocidad del pardeamiento, como la especie, variedad, y el estado fisiológico del producto vegetal (Amiot *et al*., 1992; Pérez, 2003).

Teniendo en cuenta los resultados presentados anteriormente, respecto a la selección de la variedad de chirimoya, se concluye que la chirimoya de variedad Lisa es la más adecuada, porque presenta el mayor rendimiento en pulpa presentando un 70,07%; y un menor rendimiento en pepa y cáscara con tan solo 3,10% y 26,31% respectivamente, además se observó resultados adecuados en los parámetros fisicoquímicos (*p*H, acidez titulable, sólidos solubles totales y contenido polifenólico) presentando las condiciones favorables para su procesado, comercialización y estudio posterior.

4.3. Caracterización fisicoquímica de la chirimoya

4.3.1. Características físicas.

La Tabla 20 muestra el valor promedio de peso igual a 287,74 ± 27,66 g en chirimoyas de la variedad Lisa, con un coeficiente de variación de 9,6132%, representa los valores comprendidos entre 260,08 y 315,40 g. Autores como Brito y Rodríguez (2008) reportaron pesos entre 140,81 y 335,53 g en 39 chirimoyas de la variedad Lisa mejorada, además Van Damme y Scheldeman (1999a) hallaron pesos entre 250 y 800 g al estudiar el fruto de la chirimoya, mientras De la Cruz (2015) obtuvo pesos entre 300 y 500 g al estudiar 240 frutos de chirimoya ecotipo Cumbe.

Tabla 20
Caracterización física de la chirimoya variedad Lisa

Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Volumen (ml)
287,74 ± 27,66	10,31 ± 1,03	11,84 ± 0,82	295,2 ± 41,87

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por quintuplicado ($n = 5$) donde los valores luego del signo ± indican la desviación estándar.

Al contrastar los valores, se aprecia que el rango de peso de las chirimoyas en estudio son similares a los descubiertos por otros autores, además se observa un amplio intervalo de pesos, pues a pesar de cosechar los frutos producidos en un mismo árbol, cada fruta posee un tiempo diferente de polinización. Otro factor a tener en cuenta es el acondicionamiento postcosecha, ya que una vez recolectada la fruta es de gran importancia controlar los parámetros adecuados para poder almacenarla evitando una pérdida de agua considerable, porque la chirimoya es un fruto climatérico que sigue madurando, por tal razón se consideró almacenarlos a temperatura ambiente (23° C), con una humedad relativa de 85% durante 5 días, con la finalidad de conseguir una chirimoya en estado pintón, adecuada para realizar el proceso de pulpeado y posteriormente estudiar la actividad sinérgica entre el quitosano y el ácido cítrico. Además, se concluye que la chirimoya trabajada se encuentra en la segunda categoría, por lo que es recomendable utilizar este tipo de chirimoyas para procesos destructivos como el pulpeado.

Si bien los tamaños de las chirimoyas son variables, previo a la caracterización física del fruto a estudiar se realizó una clasificación respecto a tamaños similares, obteniendo un bajo coeficiente de variación para el largo, diámetro y volumen del fruto (Anexo 30), mostrando cierta homogeneidad en las variables físicas de la chirimoya. Los resultados del largo y diámetro se encuentran cercanos a los reportados por los otros autores, deduciendo que la fruta se encontraba en un estado adecuado de madurez. Es preciso recalcar que en el pueblo La Merced de Chaute no existe un manejo tecnificado de las plantas de chirimoya, de forma que los productores manejan empíricamente el proceso de siembra y cuidado, con el propósito de conseguir frutos de un tamaño adecuado y con buena calidad.

Según Brito y Rodríguez (2008), es adecuado realizar la caracterización física del fruto antes de comenzar una investigación, a fin de conocer el grado de madurez y calidad de la fruta. Por consiguiente, la Tabla 20 indica las características físicas evaluadas en cinco frutos de chirimoya variedad Lisa procedente del Anexo La Merced de Chaute, provincia de Huarochirí, región Lima.

La determinación del largo en los frutos de chirimoya variedad Lisa (Tabla 20) arrojó un valor promedio de 10,31 ± 1,03 cm, con un coeficiente de variación de 6,7187%, que representa los valores comprendidos entre 9,28 y 11,34 cm; el diámetro (Tabla 20) posee un valor promedio de 11,84 ± 0,82 cm, con un coeficiente de variación de 6,8828%, que representa los valores comprendidos entre 11,02 y 12,66 cm; y el volumen (Tabla 20) presentó un valor promedio de 295,2 ± 41,87 ml, con un coeficiente de variación de 14,184%, que representa los valores comprendidos entre 253,33 y 337,07 ml. Autores como Brito y Rodríguez (2008) reportaron valores entre 6,91 y 9,83 cm de largo con 7,12 y 9,20 cm de diámetro, Van Damme y Scheldeman (1999a) informaron medidas entre 10 y 25 cm de largo y un máximo de 15 cm para el diámetro.

Dentro de los factores decisivos e importantes para el crecimiento y desarrollo del fruto, Agustí (2004) alude a los genéticos, la temperatura del sitio, el número de flores producidas por planta y el número de frutos en desarrollo; también indica que las técnicas de riego, fertilización, poda y raleo realizadas por el productor influyen directamente en el tamaño final del fruto. Kays & Paull (2004) indican que el tamaño de un fruto se determina a partir de sus dimensiones (largo, ancho y diámetro), peso y volumen. Por ello, Fonseca *et al.*, (2012) manifiestan que el fruto al madurar presenta un aumento en estas variables.

La variación de peso en un fruto se encuentra determinada por diversos factores que van desde la cosecha hasta el acondicionamiento postcosecha. La polinización cruzada en las chirimoyas es deficiente, obteniendo diferentes pesos del fruto a pesar de ser cosechadas del mismo árbol, ya que, si bien los pistilos se encuentran receptivos, muchas veces no existe emisión de polen, requiriendo el polen de otras flores, ya sea por viento o insectos (Morales, Cueva y Aquino, 2004; León, 2000).

La pérdida de humedad es otro factor que es determinante en la variación del peso. Según la FAO (1987), la chirimoya está compuesta principalmente de agua, suministrada

mediante el sistema radicular durante el crecimiento del fruto, cuyo abastecimiento se ve interrumpido en la cosecha, por lo tanto, el fruto utiliza sus propias reservas para sobrevivir. La respiración se desarrolla simultáneamente al proceso de transpiración, motivo por el cual existe una disminución del peso, ya que la atmósfera interna de las frutas se encuentra saturada con vapor de agua, pero al existir una diferencia de gradiente con el aire circundante menos saturado pierde agua hacia la atmósfera. Además, debido a la respiración aeróbica se produce un deterioro oxidativo celular y una disminución de agua presente en las células.

Así mismo, la temperatura es el factor de mayor importancia, pues influye en la intensidad de la respiración ya que influye en la velocidad de las reacciones enzimáticas del proceso respiratorio, donde a baja temperatura se reduce la respiración de frutas y hortalizas extendiendo su vida de poscosecha, mientras que a una alta temperatura se incrementará la respiración del producto. La humedad relativa también influye directamente en la transpiración de frutas y verduras, perdiendo agua en forma de vapor al medio ambiente; mientras el aire se encuentre más seco, se generará una mayor pérdida de agua del producto, por tal motivo es adecuado conservar los productos con una humedad relativa alta para disminuir la pérdida de agua y alargar la vida útil. Adicional, es importante mencionar que la degradación de los alimentos se ve influenciada por el tiempo de almacenamiento (FAO, 1987; Schiavinato y Harris, 2018; Mera, 2015).

Además, la chirimoya se puede clasificar en cinco categorías: super extras, extras, primera, segunda y tercera respecto al peso, los cuales oscilan en: mayor de 400 g, entre 400 y 325 g, 325 y 200 g, 200 y 100 g, y menor a 100 g según la norma de calibrado internacional (Morales *et al*., 2004), por lo tanto, según nuestro peso promedio obtenido, 287,74 g, la chirimoya en estudio tiene la calidad de ser una fruta de primera categoría, adecuada para su comercialización.

4.3.2. Análisis proximal.

En la Tabla 21 se observa la composición proximal de la chirimoya, al realizar una comparación de los valores reportados en (Sevilla, Madrid) España y (Lima) Perú, Tabla 1, se aprecia que el contenido de grasas y cenizas permanece dentro de los valores comparados, el de proteínas, carbohidratos y fibra cruda se encuentran cercanos, mientras que el valor de humedad se diferencia mucho, colocándose como el menor. El valor de cenizas manifiesta la cantidad de mineral que el fruto ha logrado almacenar hasta el momento antes de la cosecha (Navarro *et al*., 2018).

Tabla 21
Composición proximal de la chirimoya variedad Lisa

Componente	(g/100 g de pulpa)
Humedad	73,6
Proteínas	1,6
Grasas	0,3
Carbohidratos	22,6
Fibra cruda	1,1
Cenizas	0,8

La diferencia en los valores de cada componente se debe principalmente a los diferentes métodos utilizados, por ejemplo, el contenido de cenizas, en esta investigación, se determinó con el método de calcinación por vía seca utilizando mufla, pero existen otros métodos, tal es el caso de la calcinación por vía húmeda usando mufla o microondas, entre otras; mientras que el contenido de humedad se realizó por desecación en estufa, pero también se puede realizar por el método de Fisher o métodos físicos.

Según Navarro, Guzmán y Gonzalez (2018) y González (2013) el desarrollo físico y la composición química de una planta se ve condicionada por el lugar de cultivo, debido a las propiedades del suelo, condiciones del clima, exposición a agentes patógenos, época de cosecha, edad de las plantaciones, tipo de polinización, entre otros, de modo que se alteran las características del fruto, debido a relación genotipo - ambiente. Los cultivares de chirimoya más destacados son 'Fino de Jete' en España, 'Bronceada' y 'Concha Lisa' en Chile y 'Cumbe' en Perú. Además, según Pérez (2013) no todas las tablas de composición de alimentos indican la variabilidad de cada nutriente (desviación estándar, límites de confianza), número de muestras analizadas, que informen al usuario de su fiabilidad. Por lo tanto, estos factores externos conllevan a tener diferencias en la composición obtenida de la chirimoya variedad Lisa estudiada, respecto a los valores reportados por otros autores mostrados en la Tabla 1.

4.4. Evaluación de la actividad sinérgica

Con el objetivo de estudiar y evidenciar el posible efecto sinérgico entre el quitosano y el ácido cítrico en el retraso del pardeamiento enzimático producidos en la pulpa de chirimoya, se evaluaron de forma independiente el efecto producido por cada uno de estos compuestos, así como la mezcla de ambos más una muestra control. Se evaluaron y discutieron los cambios fisicoquímicos producidos producto del pardeamiento originado durante su almacenamiento, las cuales se detallan a continuación.

La Figura 26 muestra el comportamiento de la acidez y el *p*H, en la chirimoya control (blanco) y las chirimoyas tratadas, durante los 120 días de evaluación. Respecto a la acidez, el blanco y tratamiento 0,75% CS muestran similar conducta, pero diferente a los otros dos tratamientos; mientras que en la evolución del *p*H, el proceder fue inverso al reportado en la acidez titulable, situación coherente debido a la relación interdependiente que existe entre ambas, mencionado por Nisar *et al*., (2015) y Nielsen (2010) en la selección de la variedad.

4.4.1. Acidez titulable y *p*H.

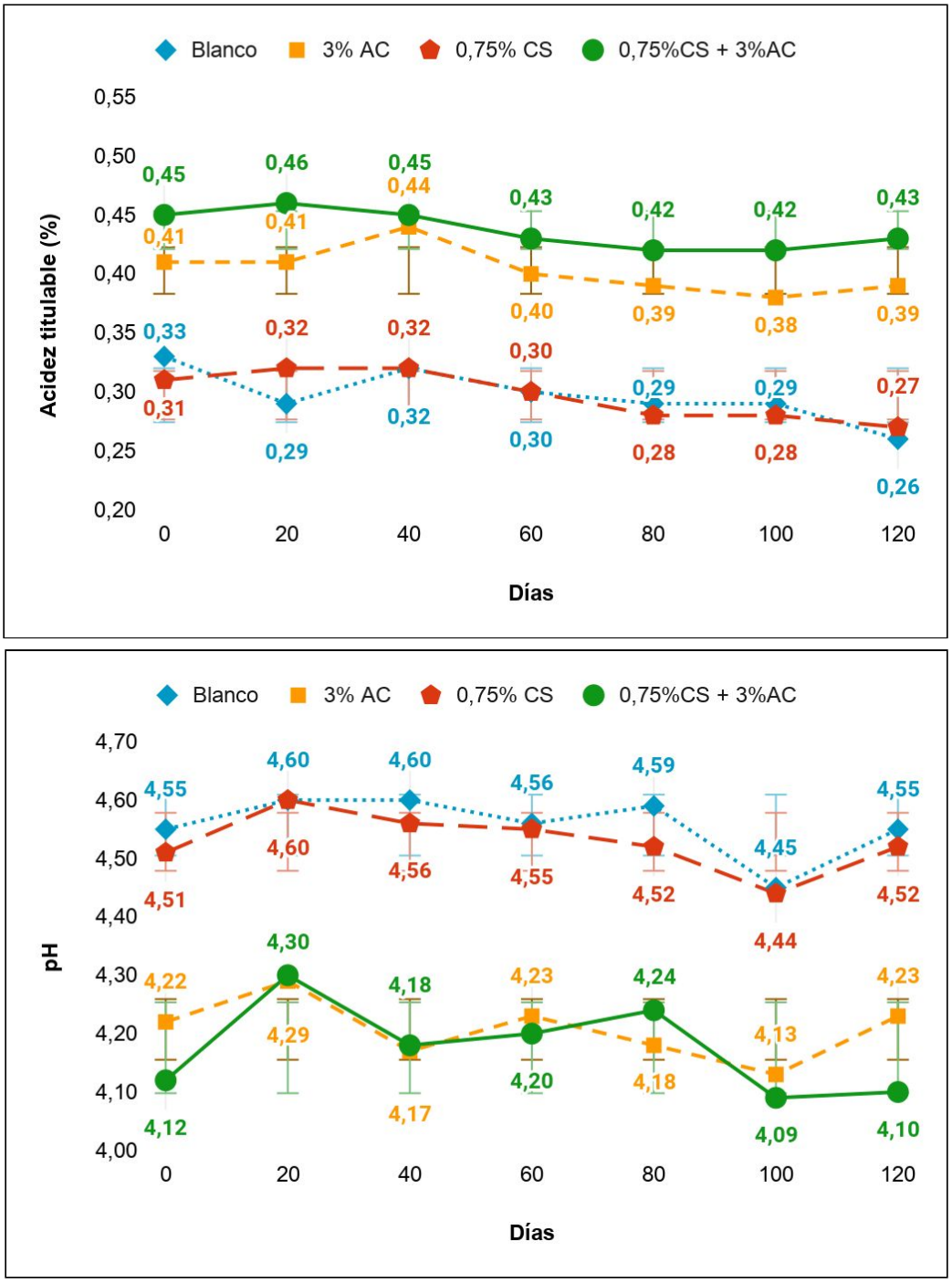


Figura 26. Variación de acidez titulable y *p*H con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

Asimismo, la evolución de la acidez y *p*H guarda relación con lo expuesto por otros autores que estudiaron otros frutos, por ejemplo, Gil, Conesa & Artés (2002) observaron una reducción en la acidez de tomates frescos cortados, almacenados en atmósfera modificada a 0 y 5º C durante 10 días, además, Martínez y Cantwell (2002), al estudiar hojas de espinaca almacenadas en atmósferas controladas a 7,5º C también lograron apreciar una disminución en la acidez titulable y un aumento de *p*H. Pantastico (1981) afirma que el aumento del *p*H ocurre debido a la reducción de la acidez titulable total (ATT).

La acidez es un componente fundamental junto al dulzor y al aroma en el sabor de las frutas y hortalizas y se debe principalmente a la presencia de los ácidos orgánicos málico y cítrico, los que se encuentran en distintas proporciones en la mayoría de los frutos maduros. La acidez está determinada por las concentraciones de ácidos orgánicos predominantes como son ácido cítrico, ácido málico y ácido tartárico; algunos aminoácidos, tales como aspártico y glutámico, pueden también contribuyen a la acidez (Kader, 2008). La acumulación de estos dos ácidos a nivel celular es el resultado de varios procesos interrelacionados que tienen lugar en distintos compartimientos celulares (citosol, mitocondria y glioxisoma). En el fruto, si bien los ácidos orgánicos son suministrados por la savia, las variaciones de estos se deben principalmente al metabolismo del malato y citrato en el mismo fruto (Lobit, Genard, Soing & Habib, 2006). Por lo general, la concentración de los ácidos orgánicos aumenta durante el desarrollo del fruto, luego en las últimas etapas existe un cambio en la acumulación por la degradación de los mismos, para dar lugar a la síntesis de azúcares (Etienne, Genard, Lobit, Mbeguie y Bugaud, 2013). Los ácidos orgánicos contribuyen en gran parte al sabor, en una relación típica entre azúcares y ácidos en las diferentes especies de frutas (Wills, McGlasson, Graham & Joyce, 1998). Los precursores de los ácidos orgánicos, en su mayoría, son otros ácidos orgánicos o azúcares (Kays y Paull, 2004). Debido a lo anterior mencionado, en la Figura 26, se aprecia una disminución de la acidez indistinto del tratamiento, quiere decir que la fruta está madurando con el pasar de las semanas degradando la cantidad de ácidos, presentes en el día 0, para sintetizar azúcares, evidencia de una alta tasa metabólica, por ello el aumento del dulzor al madurar la fruta, característico en los frutos climatéricos.

La acidez es el resultado de dos procesos metabólicos simultáneos: el incremento de carbohidratos totales y la disminución del ácido cítrico, que se encuentra asociada a la calidad de consumo de los frutos (Pérez, 2010). En los frutos, la vacuola ocupa más del 90% del volumen celular, teniendo un *p*H ácido menor a 5 (Nanos & Kader, 1993), afirmación que coincide con los resultados encontrados en las chirimoyas de la variedad Lisa analizadas.

La concentración del compuesto inhibidor de pardeamiento, tales como quitosano y ácido cítrico, mantienen una relación directa con la concentración de acidez presente en la muestra (Sepúlveda, 2010). La combinación de quitosano y ácido cítrico produce un valor de *p*H más bajo a comparación de emplear únicamente ácido cítrico en una fruta (Apai, Sardsud, Boonprasom & Sardsud, 2009). Como ya se ha mencionado, la enzima polifenol oxidasa es la causante del pardeamiento enzimático, cuyo *p*H óptimo se encuentra entre 5,0 - 7,0; pero se inhibe su acción a un *p*H menor de 3,0 (Dondero, Badilla, Tarky y Garrido, 1985).

En la Tabla 22 se aprecian los valores de la acidez titulable obtenidos a partir de los tratamientos estudiados para cada día de evaluación, donde el tratamiento control o blanco (T_1) presentó la mayor variación, registrando una disminución de 0,07 mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra; por otro lado, si bien los tratamientos T_2 **y** T_4, ambas conformadas por ácido cítrico y el último mezclado con quitosano, presentaron un descenso gradual, cuya disminución total fue de tan solo 0,02 mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra fresca, siendo estos los tratamientos que presentaron una menor variación, seguido por el tratamiento T_3 que en su formulación sólo contenía quitosano, con una variación de 0,04 mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra. El contenido del ácido cítrico, acidez titulable, decrece en la medida que el fruto se desarrolla, debido a que los ácidos orgánicos presentes se van transformando en otras sustancias (azúcares) en los procesos de respiración. La disminución de la acidez titulable se puede explicar a que las células son hábiles en usar ácidos orgánicos como sustrato en su respiración (Ulrich , 1970).

Tabla 22

Variación de la acidez titulable expresada en mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra fresca almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,26 ± 0,00
T_2 = **3%AC**	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01
T_3 = **0.75%CS**	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,02
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	0,45 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 3$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

En la Tabla 23, el análisis de varianza, a un nivel de confianza del 95%, muestra una considerable diferencia significativa ($p < 0,0001$) entre los tratamientos, por ende, sí se logra producir un efecto, en la acidez, por parte de los diferentes tratamientos, adicional, se manifiesta que también existe un efecto del tiempo de almacenamiento, pero este no interfiere en nuestro análisis debido al diseño estadístico utilizado.

Tabla 23

Cuadro del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la acidez titulable

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Modelo	0,12	9	0,01	110,13	<0,0001
Tratamiento	0,11	3	0,04	309,42	<0,0001
Bloque (Días)	0,01	6	1,2 E-03	10,49	<0,0001
Error	2,1 E-03	18	1,2 E-04		
Total	0,12	27			

En la Tabla 24 se aprecian los valores de *p*H obtenidos a partir de los tratamientos estudiados. El comportamiento del *p*H se ha mantenido estable a lo largo de los días evaluados, en algunos casos con ligeros aumentos en su valor respecto al primer día de evaluación. En el tratamiento T_4 se aprecia un aumento de 0,18 en el valor del *p*H para el día 20, comportamiento previamente explicado, posterior a ello, se observa un leve decrecimiento, este comportamiento descendente es similar a los reportados en otros frutos. Autores como Nisar *et al*., (2015) obtuvieron, a un nivel de significancia ($p < 0,05$), una disminución de *p*H en pulpa de manzana almacenadas a 25° C, el valor más bajo fue atribuida a la muestra de pulpa que recibió un tratamiento térmico junto a la adición de preservantes (0,1% metabisulfito de potasio + 0,1% ácido cítrico) reportando una variación de *p*H (3,83 - 2,95) durante 90 días de almacenamiento, mientras que los valores más altos de pH fue para la muestra de pulpa con tratamiento térmico, generando una variación de *p*H (4,41 - 4,21) durante 30 días de almacenamiento. Por otro lado, Wisal, Ullah, Zeb & Khan (2013) apreciaron la mayor disminución del contenido de *p*H para la muestra con jugo de fresa (7,5 °Brix) libre de conservantes, donde el *p*H varió de 3,51 a 2,82; seguido de la muestra con jugo de fresa (20,5 °Brix) libre de conservantes, cuya variación de *p*H fue de 3,60 a 2,99; mientras el tratamiento que mostró una mínima disminución fue para la muestra con pulpa de fresa (30,5 °Brix) junto a la adición de 0,05% de benzoato de sodio + 0,05% de sorbato de potasio, cuya variación de *p*H fue de 3.68 a 3,33; seguido de la muestra con pulpa de fresa (30,5 °Brix) junto a la adición de 0,1% de sodio benzoato y la muestra con pulpa de fresa (30,5 °Brix) junto a la adición de 0,1% de sorbato de potasio, donde la variación de *p*H, para ambos casos, fue de 3,68 a 3,08. Todas las muestras fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4 - 10 ° C) durante 360 días. Hussain, Zeb & Ayub (2011) atribuyen que la disminución de los valores de *p*H y el aumento de la acidez titulable total durante el almacenamiento puede deberse a la actividad de algunas bacterias productoras de ácido, como *Alicyclobacillus acidoterrestris.*

Tabla 24

Variación del pH en pulpa de chirimoya almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	4,55 ± 0,03	4,60 ± 0,01	4,60 ± 0,03	4,56 ± 0,03	4,59 ± 0,03	4,45 ± 0,02	4,55 ± 0,02
T_2 = **3%AC**	4,22 ± 0,03	4,29 ± 0,01	4,17 ± 0,02	4,23 ± 0,03	4,18 ± 0,02	4,13 ± 0,02	4,23 ± 0,03
T_3 = **0.75%CS**	4,51 ± 0,02	4,60 ± 0,01	4,56 ± 0,03	4,55 ± 0,02	4,52 ± 0,01	4,44 ± 0,02	4,52 ± 0,02
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	4,12 ± 0,01	4,30 ± 0,01	4,18 ± 0,02	4,20 ± 0,02	4,24 ± 0,01	4,09 ± 0,02	4,10 ± 0,03

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 3$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

En la Tabla 25 se encontró que, con un nivel de confianza al 95%, existe una diferencia significativa ($p < 0,0001$) entre los tratamientos, adicional, se manifiesta que sí hay un efecto en el tiempo de almacenamiento. En este tipo de respuesta, no se sabe si el *p*H aumenta como consecuencia de los efectos del CO_2 sobre el metabolismo normal, o es una reacción directa por el tejido vegetal a contrarrestar los efectos de acidificación ocasionados por el CO_2

(Kader, 1986). Aunque se sugiere que las razones del incremento del *p*H durante el almacenamiento en atmósferas controladas, podría ser efecto de una disminución en la actividad respiratoria, aumento en la fijación de CO_2 o debida a la presencia de una enzima menos activa que convierte el ácido málico en oxalacetato o piruvato (Pantastico, 1979). Los azúcares solubles y los ácidos orgánicos contribuyen indirectamente al metabolismo fenólico al alterar el *p*H y mediante el uso como componentes básicos para los compuestos fenólicos (Perkins y Collins, 2001).

Tabla 25

Cuadro del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Modelo	0,93	9	0,10	89,91	<0,0001
Tratamiento	0,87	3	0,29	251,55	<0,0001
Bloque (Días)	0,06	6	0,01	9,09	0,0001
Error	0,02	18	1,2 E-03		
Total	0,95	27			

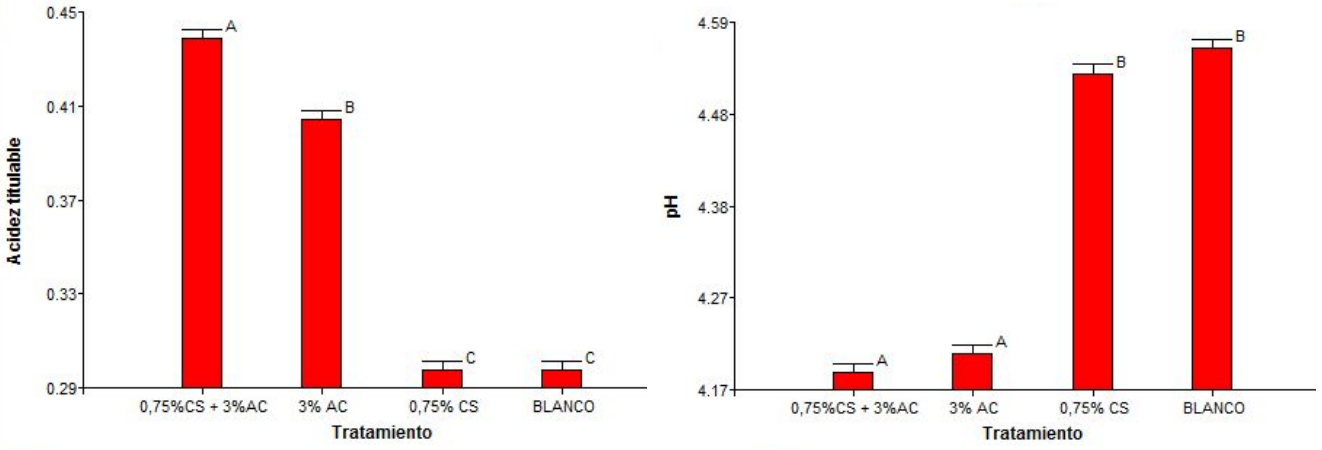


Figura 27. Comparación de la acidez titulable y *p*H entre los tratamientos, luego de los 120 días en almacenamiento, según la prueba de Tukey.

En la acidez titulable, el Anova mostró que sí existe un efecto significativo, se realizó la comparación de los diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey (Figura 27). Al observar la figura se concluye que los tratamientos T_1 y T_3 no difieren entre sí, pero al compararlos con T_4 y T_2, si se muestra que entre ellas existe una diferencia significativa, donde el mayor contenido de acidez lo obtiene T_4, esto significa que conservó mejor la calidad de la chirimoya durante los 120 días de almacenamiento, seguido del T_2. De igual manera, en el *p*H, el Anova también mostró que existe un efecto significativo, al realizar la prueba de Tukey (Figura 27) se apreció que los tratamientos T_4 y T_2 difieren de T_1 y T_3, donde el menor *p*H lo encontramos en los dos primeros esto significa que conservó mejor la calidad de la chirimoya durante los 120 días de almacenamiento. A partir de ambos resultados, se puede indicar que la interacción entre el quitosano y ácido cítrico logra una

mejor conservación de la calidad en el fruto de chirimoya, ya que la acidez es un indicador del estado de madurez en un fruto. Además, el *p*H influye en la actividad de la enzima polifenoloxidasa, esta relación se detallará más adelante en la evaluación de la actividad de la enzima.

4.4.2. Sólidos solubles totales.

La Figura 28 muestra esta variación, donde los resultados presentados para los SST se expresaron en °Brix, siguiendo el método AOAC 932.12 Ed 19 descrito por Robledo (2007). El propósito de esta investigación es comprobar si existe una posible acción sinérgica entre el quitosano y el ácido cítrico en la pulpa de chirimoya que provoque una diferencia en los valores de sólidos solubles totales recolectados durante los 120 días de almacenamiento a -20° C, donde se puede apreciar un comportamiento ascendente, tal que los valores de °Brix aumentan en todos los tratamientos evaluados durante los 120 días de almacenamiento. Se muestra aparentemente que los cuatro tratamientos tienen similar comportamiento, aunque el tratamiento control o blanco (T_1) presentó un leve aumento después del día 40 hasta el último día de evaluación. El comportamiento ascendente que se observa concuerda con lo reportado en otras frutas por autores como Quintero *et al*., (2013) observaron un aumento en el contenido en los °Brix de mangos en tres estados de madurez fisiológicos almacenados a temperatura ambiente de 25° C durante 10 días. Del Pilar, Fischer y Corredor (2007) también encontraron un aumento en los °Brix al estudiar la gulupa en diferentes estados de madurez.

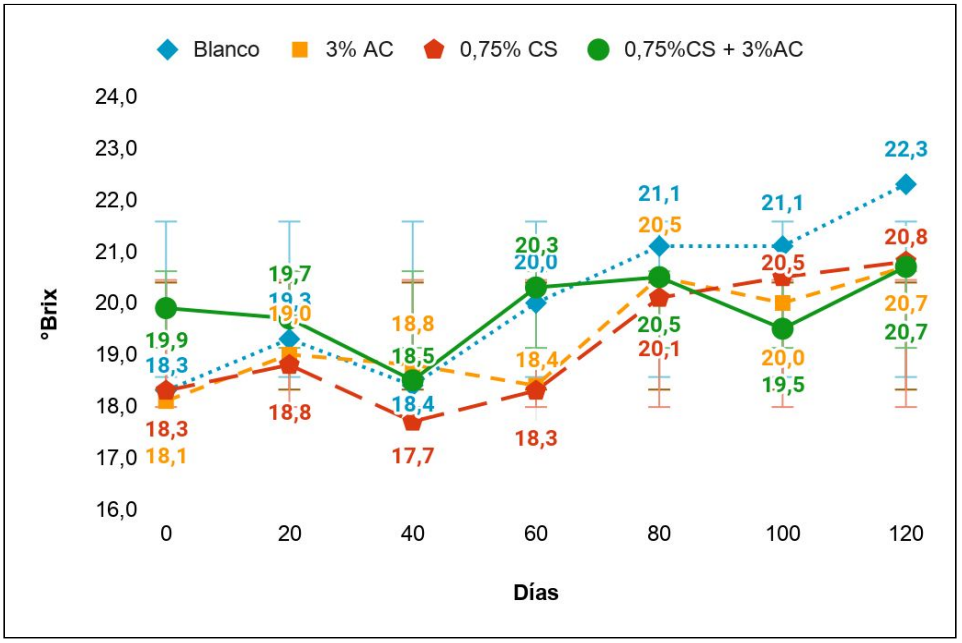


Figura 28. Variación de los sólidos solubles totales (°Brix) con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

La madurez se refleja a partir del comportamiento de los SST o °Brix. El contenido de SST está constituido por 80 a 95% de azúcares, donde la cantidad presente en el fruto depende de la variedad, relación hoja/fruto, condiciones climáticas durante el desarrollo del fruto, estado de desarrollo y madurez (Osterloh, Ebert, Held, Schulz & Urban, 1996). El tiempo que transcurre entre el desarrollo del fruto hasta conseguir su madurez de consumo,

debido a la relación entre los sólidos solubles totales y la acidez, puede variar dentro de una misma variedad si es sometida a zonas con diferentes climas (Pérez, 2010).

Los azúcares sencillos se encuentran principalmente en las frutas maduras y el almidón en las que aún no han madurado (Vila, 2006). Los sólidos solubles es uno de los parámetros fisicoquímicos de mayor interés en los procesos de maduración, ya que gracias a la hidrólisis de los almidones ocurrida con ayuda de las amilasas propias del fruto, se comienza a liberar una gran cantidad de moléculas de glucosa que hacen que el fruto aumente su cantidad de sólidos solubles lo cual se ve reflejado en el aumento de los °Brix, provocando que el fruto se vuelva más dulce, por ende más apreciable para el consumidor, pero a su vez se hace más atractivo a bacterias, roedores e insectos (Quintero, Giraldo, Lucas y Vasco, 2013).

Por lo anterior mencionado y apreciando la Figura 28, se puede indicar que existe un aumento de los °Brix durante el tiempo de almacenamiento, indistinto del tratamiento, aunque el tratamiento T_1 tuvo un aumento más pronunciado respecto a los otros, esto quiere decir que la chirimoya presenta una continua hidrólisis del almidón, liberando moléculas de glucosa, aumentando por ende los °Brix y el dulzor.

En la Tabla 26 se aprecian los valores de °Brix obtenidos a partir de los tratamientos estudiados. El comportamiento de los °Brix ha mostrado un aumento gradual de sus valores a lo largo de los días evaluados en cada tratamiento evaluado. En el tratamiento T_4 se aprecia un aumento de tan solo 0,6 en el valor de °Brix al término de los días en evaluación, este comportamiento ascendente es similar a los reportados en otros frutos como se mencionó anteriormente.

Tabla 26

Variación del °Brix en pulpa de chirimoya almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	18,3 ± 0,23	19,3 ± 0,42	18,4 ± 0,40	20,0 ± 0,40	21,1 ± 0,46	21,1 ± 0,40	22,3 ± 0,46
T_2 = **3%AC**	18,1 ± 0,23	19,0 ± 0,20	18,8 ± 0,40	18,4 ± 0,40	20,5 ± 0,23	20,0 ± 0,00	20,7 ± 0,23
T_3 = **0.75%CS**	18,3 ± 0,23	18,8 ± 0,20	17,7 ± 0,46	18,3 ± 0,23	20,1 ± 0,12	20,5 ± 0,06	20,8 ± 0,00
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	19,9 ± 0,12	19,7 ± 0,12	18,5 ± 0,23	20,3 ± 0,23	20,5 ± 0,23	19,5 ± 0,23	20,7 ± 0,12

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 3$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

En los sólidos solubles totales se observa que el valor de los °Brix se ve influido por el grado de madurez del fruto, además la combinación de este con la acidez nos ayuda a tener un fruto con buenas características sensoriales logrando ser atractivo para el consumidor (Osterloh *et al*., 1996).

Posterior a realizar el análisis de varianza, con un nivel de confianza al 95%, obtenemos la Tabla 27, donde no se aprecia una diferencia significativa, pues para los tratamientos el valor obtenido que muestra es p = 0,0526; siendo este mayor a 0,05; por lo tanto, se puede

afirmar que no se logra producir un efecto en los sólidos solubles totales, demostrando que al aplicar cualquiera de estos cuatro tratamientos logran conservar la dulzura característica de la chirimoya, por el contrario, se observa que sí existe un efecto del tiempo de almacenamiento, pero este no interfiere en nuestro análisis debido al diseño estadístico empleado. Según Gutiérrez, Del Mar, Pascual & Vargas (1994) explican que el almidón se hidroliza totalmente durante la maduración de las frutas almacenadas a temperaturas entre 12° C a 22° C, convirtiéndose principalmente en glucosa y fructosa, con la acumulación transitoria de sacarosa, además, el almacenamiento a temperaturas de refrigeración (4° C o 1° C) produce una disminución en la velocidad de hidrólisis del almidón y por consiguiente en la concentración de monosacáridos. Lo mencionado anteriormente explica el porqué de no encontrar diferencias en los tratamientos, ya que estos fueron almacenados a temperaturas más bajas que las de refrigeración, por ende el almidón, contenido en la pulpa de chirimoya, no logró ser hidrolizada en glucosa y fructosa, cuyo contenido de azúcares es reportado en el refractómetro.

Tabla 27

Cuadro del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los °Brix

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadrados medios**	**F**	**p-valor**
Modelo	29,21	9	3,25	8,63	0,0001
Tratamiento	3,50	3	1,17	3,10	0,0526
Bloque (Días)	25,70	6	4,28	11,39	<0,0001
Error	6,77	18	0,38		
Total	35,98	27			

El Anova realizado a los valores de °Brix nos mostraron que no existe un efecto significativo, para verificar dicha información se realizó la comparación de los diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey (Figura 29). Al observar la figura se concluye que, a pesar de los valores promedios obtenidos para cada tratamiento (T_1, T_2, T_3 y T_4) no difieren entre sí, por lo tanto, no se muestra que entre ellas exista una diferencia significativa, esto significa que, indistintamente del tratamiento, se logra conservar la calidad en el fruto de chirimoya durante los 120 días de almacenamiento.

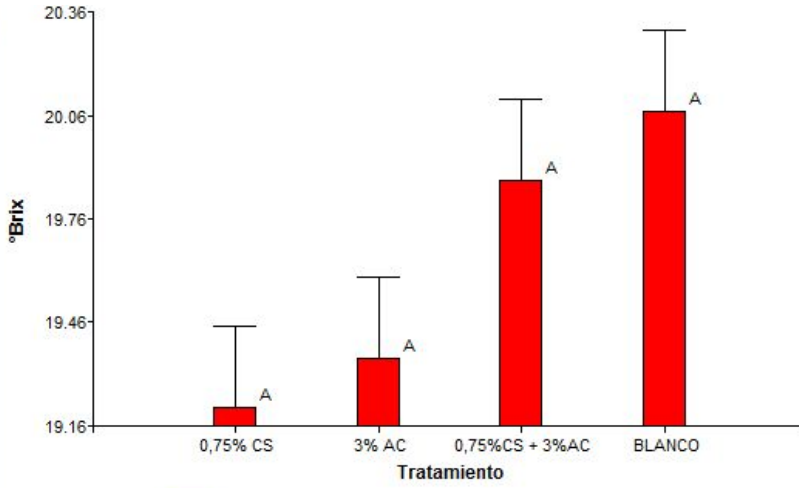


Figura 29. Comparación de los °Brix entre los tratamientos, luego de los 120 días en almacenamiento, según la prueba de Tukey.

4.4.3. Contenido de polifenoles totales.

En la Figura 30, todos los resultados obtenidos se expresaron en mg de ácido gálico/ 100 g de pulpa de chirimoya fresca, cuyo cálculo se realizó siguiendo el método de Folin Ciocalteu descritos por García *et al*. (2015). Con la finalidad de observar una posible acción sinergista entre el quitosano y el ácido cítrico en el control del pardeamiento, se evaluó la variación de los compuestos fenólicos durante 120 días de almacenamiento a -20° C, permitiendo estudiar la probable interdependencia que existe entre el contenido de polifenoles totales y el desarrollo enzimático que afecta a la pulpa de chirimoya.

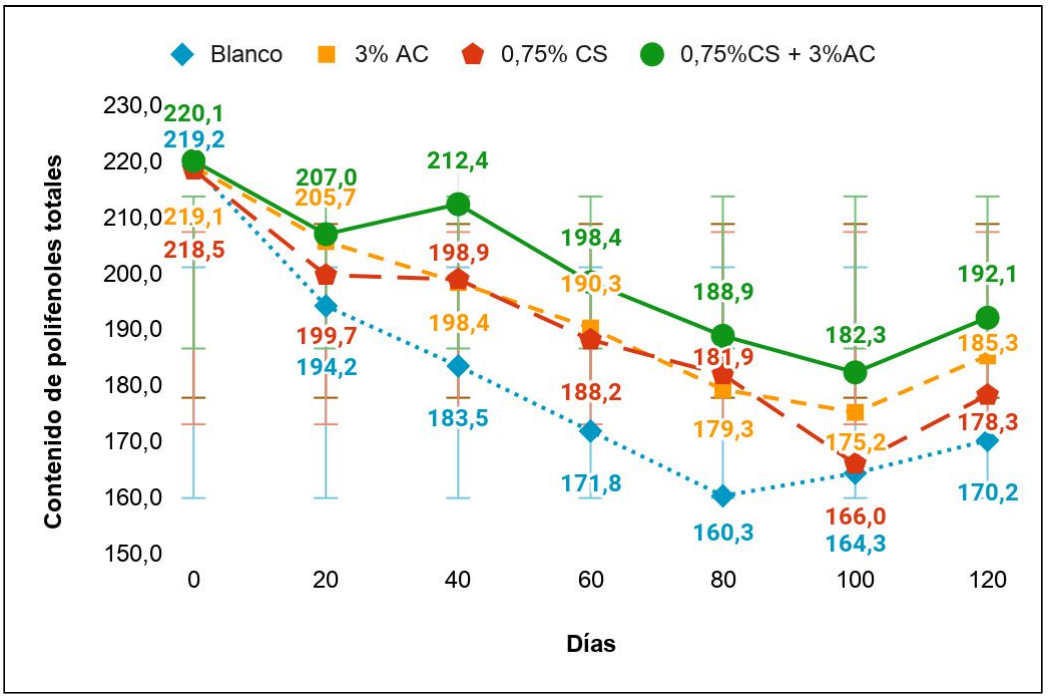


Figura 30. Variación del contenido de polifenoles totales con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

El comportamiento descendente que se detalla en la Figura 30, muestra una disminución de los compuestos polifenólicos en todos los tratamientos durante los 120 días de evaluación. Similar comportamiento fueron encontrados por Campos *et al*. (2008) donde observaron una reducción de los compuestos fenólicos en la evaluación de la chirimoya mínimamente procesada. Esta disminución, probablemente se deba a la degradación oxidativa que sufre estos compuestos al reaccionar con la polifenoloxidasa en presencia del oxígeno dando lugar al pardeamiento de la pulpa (Morante *et al*., 2014; Amiot *et al.*, 1992; García *et al*., 2015).

Amiot *et al*. (1992) señalan que muchos investigadores concluyen que la susceptibilidad del pardeamiento enzimático en diversas frutas se debe a la interacción que existe entre el contenido de compuestos polifenólicos y la actividad de la enzima polifenoloxidasa; sin embargo, cierto grupo sostienen que el factor determinante en el desarrollo del pardeamiento es originado por la alta actividad enzimática, mientras que otros científicos como Coseteng & Lee (1987) señalan como factor principal al contenido y tipos de compuestos polifenólicos que presenta una determinada fruta.

A pesar de los diversos factores que repercuten en la rapidez del pardeamiento, existe la forma de controlar este fenómeno mediante un adecuado conocimiento bioquímico del tipo de sustrato fenólico que presenta la pulpa de chirimoya, además de regular la accesibilidad del oxígeno o logrando reducir la actividad enzimática por medio de su inhibición (Morante *et al*., 2014; Jiang *et al*., 2016).

La Tabla 28 detalla los valores específicos de polifenoles totales cuantificados para cada día de evaluación, siendo el tratamiento control o blanco (T_1) el que presentó la mayor variación de estos compuestos, registrando una oxidación total de 49,4 mg de ácido gálico/100g de muestra fresca; sin embargo el tratamiento T_4 cuya solución está formada por la mezcla de quitosano y ácido cítrico se comportó de forma antagónica, mostrando solo una disminución total de 28 mg de ácido gálico/100g de pulpa en fresco, siendo este el tratamiento que presentó menor variación, seguidos por los tratamientos T_2 y T_3 el cual se emplearon soluciones de ácido cítrico y quitosano por separado, reportando oxidaciones enzimáticas de 33,8 y 36,17 mg de ácido gálico/100g de muestra húmeda respectivamente. La composición polifenólica que presenta la chirimoya, es de gran relevancia en la comprensión de la rapidez del pardeamiento que sufre la pulpa (Bello, 2000). Además en base a las investigaciones realizadas por Barea (2015) y Arun *et al*. (2011) afirman que la chirimoya presenta en su perfil polifenólico cantidades notables de los derivados del ácido hidroxicinámico (ácido cafeico, ácido ferúlico y el ácido cumárico) flavonoides y taninos, los cuales son muy susceptibles a su degradación debida a la oxidación enzimática, produciendo compuestos muy reactivos llamadas quinonas, el cual se condensan formando polímeros pardos conocido como melaminas (Bello, 2000; García *et al*., 2015; Friedman, 1997). Esto nos lleva a inferir, a partir de los resultados obtenidos, que el tratamiento control (T_1) al no presentar algún agente antioxidante que ayude a controlar la oxidación enzimática, muestra

un rápido pardeamiento debido a la alta velocidad de oxidación por parte de los polifenoles presente en la pulpa.

Tabla 28

Variación del contenido de polifenoles totales en pulpa de chirimoya almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	219,2 ± 2,65	194,2 ± 8,57	183,5 ± 8,92	171,8 ± 7,89	160,3 ± 12,71	164,3 ± 3,75	170,2 ± 8,33
T_2 = **3%AC**	219,1 ± 7,14	205,7 ± 10,61	198,4 ± 13,93	190,3 ± 9,67	179,3 ± 1,77	175,2 ± 7,98	185,3 ± 17,03
T_3 = **0.75%CS**	218,5 ± 0,99	199,7 ± 5,80	198,9 ± 9,58	188,2 ± 16,27	181,9 ± 3,61	165,9 ± 9,71	182,3 ± 7,38
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	220,1 ± 1,53	207,0 ± 14,98	212,4 ± 16,03	198,4 ± 9,33	188,9 ± 6,82	182,3 ± 3,44	192,1 ± 10,29

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 3$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

Con el objetivo de encontrar algún efecto significativo producido por los diferentes tratamientos empleados sobre la variación del contenido de polifenoles totales, se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos. De esta manera, de la Tabla 29 se puede afirmar, con una significancia del 0,05 una notable diferencia significativa ($p < 0,0001$) sobre el efecto que producen los tratamientos respecto a la oxidación de los compuestos fenólicos durante su almacenamiento.

Tabla 29

Cuadro del análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el contenido de polifenoles totales

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadrados medios**	**F**	**p-valor**
Modelo	7848,06	9	872,01	37,42	<0,0001
Tratamiento	1401,93	3	467,31	20,05	<0,0001
Bloque (Días)	6446,13	6	1074,35	46,10	<0,0001
Error	419,48	18	23,30		
Total	8267,54	27			

Como consecuencia al efecto significativo encontrado, se procedió a comparar los diferentes tratamientos mediante la prueba de Tukey. De la Figura 31 se encontró una diferencia significativa entre todos, siendo el tratamiento T_4 el que menor oxidación enzimática produjo, por lo que se puede catalogar estadísticamente como el tratamiento más eficaz, debido al lento pardeamiento que se puede observar en la pulpa de chirimoya durante los 120 días de almacenamiento, seguidos de los tratamientos T_2, T_3 y T_1 respectivamente. Este resultado indicaría que posiblemente existe una interacción entre el quitosano y ácido cítrico el cual ayude a retardar la formación de quinonas, logrando ser más efectivo que las soluciones de quitosano o ácido cítrico por separado.

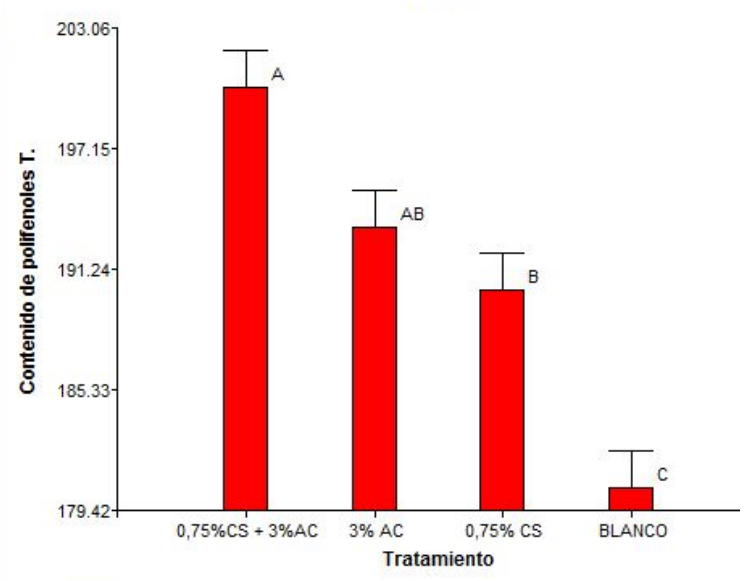


Figura 31. Comparación del contenido de polifenoles totales entre los tratamientos, luego de los 120 días en almacenamiento, según la prueba de Tukey.

Los óptimos resultados obtenidos por los tratamientos T_4 y por debajo el T_3, los cuales involucran en su formulación soluciones de quitosano, pueda que tenga explicación a causa de las diferentes propiedades que brinda la aplicación de soluciones, películas o recubrimientos a base de este biopolímero en el control del pardeamiento enzimático de diversas frutas, provocando un retraso en los cambios del contenido de antocianinas, flavonoides y polifenoles totales, incluso induce a la reducción de la actividad de la polifenoloxidasa, debido a la formación de una capa de película y/o cobertura en la superficie externa de la pulpa, donde gracias a la baja permeabilidad con el oxígeno provoca un menor contacto con el aire presente en el interior del envase sellado, logrando disminuir la velocidad de oxidación (Zhang & Quantick, 1997; Georgantelis, Blekas, Katikou, Ambrosiadis & Fleotouris, 2007).

Adicionalmente a esto, se le atribuye la capacidad antioxidante de la solución de quitosano, actuando como agente antioxidante secundario, debido a su eficiencia de quelación contra iones metálicos, las cuales inducen al inicio de la oxidación, generando mucho más el retraso en la disminución del contenido fenólico de la pulpa (García, 2015). La propiedad quelante que proporciona al aplicar soluciones de quitosano en diferentes alimentos se debe a la interacción que se genera entre el quitosano y iones metálicos de transición y postransición, como el Cu^{+2} que forma parte del grupo prostético de la polifenoloxidasa y fundamental en la iniciación del pardeamiento enzimático. Esta interacción se logra gracias a los grupos aminas e hidroxilos muy reactivos que presenta el quitosano en su estructura química, comportándose como un polielectrolito catiónico que por debajo de un *p*H 6,5 presenta una alta densidad de carga formando quelatos con los iones metálicos (Gacén y Gacén, 1996; Mármol *et al*., 2011).

Por otro lado, el factor ácido cítrico también mostró un efecto significativo con respecto a la variación de los polifenoles totales presente en la pulpa de chirimoya. En la industria

alimentaria el uso del ácido cítrico principalmente se debe a la acidificación y control del *p*H que causa en el producto final (Muñoz *et al*., 2014). Un *p*H bajo, puede retardar el crecimiento de microorganismos indeseables como las bacterias además de inactivar enzimas indeseables como la polifenoloxidasas, debido a su baja actividad por debajo de un *p*H 4, constituyendo de esta manera una forma de control del pardeamiento enzimático (Papagianni, 2007; Chahuayo, 2014; Silveira, 2017). La reducción de la actividad de la PPO provoca una disminución en las reacciones de pardeamiento enzimático por lo que la oxidación de compuestos polifenólicos a orto quinonas se vería también reducido, los resultados de la baja actividad enzimática provocada por el uso del ácido cítrico se puede observar en la Tabla 30. De esta manera, se explica los óptimos resultados obtenidos por los tratamientos T_4 seguido por el T_2, en el que se aplica soluciones de ácido cítrico que a comparación del tratamiento control (T_1) estas muestran una menor reducción de los polifenoles totales debido a la baja actividad de la enzima durante los 120 días de evaluación.

A pesar del comportamiento descendente del contenido polifenólico en la pulpa de chirimoya, el tratamiento T_4 (solución de quitosano al 0,75% disuelto en ácido cítrico al 3%) presentó un ligero aumento de estos compuestos fenólicos durante los días 20 y 100 de almacenamiento, registrándose un incremento de 5,4 y 9,8 mg ácido gálico/100 g de muestra para cada fecha de evaluación respectivamente. De igual manera el tratamiento T_3 cuya pulpa solo contenía solución de quitosano al 0,75% presentó un aumento de 16,4 mg ácido gálico/100g de pulpa fresca solo para el dia 100 de evaluacion, posiblemente esto se deba a la capacidad que presenta el quitosano para atrapar radicales libres y a su capacidad reductora, consiguiendo provocar la reducción de las orto quinonas producidas por el pardeamiento enzimático a sus compuestos fenólicos iniciales (Sánchez, 2016). Dicho aumento también se logra observar en el tratamiento T_2 (solución de ácido cítrico) para el día 100 de evaluación, cuantificando un incremento de 10,1 mg ácido gálico/100 g de pulpa. Esto posiblemente tenga explicación debido a las diferentes propiedades que otorga en los alimentos la adición de ácido cítrico, siendo la propiedad antioxidante el que ayudaría a reducir quinonas retardando el pardeamiento (Muñoz *et al*., 2014; Papagianni, 2007).

4.4.4. Actividad de la enzima polifenoloxidasa.

La Figura 32 muestra la variación de la actividad enzimática que presenta la PPO en la pulpa de chirimoya durante 120 días en almacenamiento a -20° C, donde todos los resultados obtenidos se expresaron en Unidades de PPO/min x g de pulpa fresca, según la metodología descrita por Casado (2004).

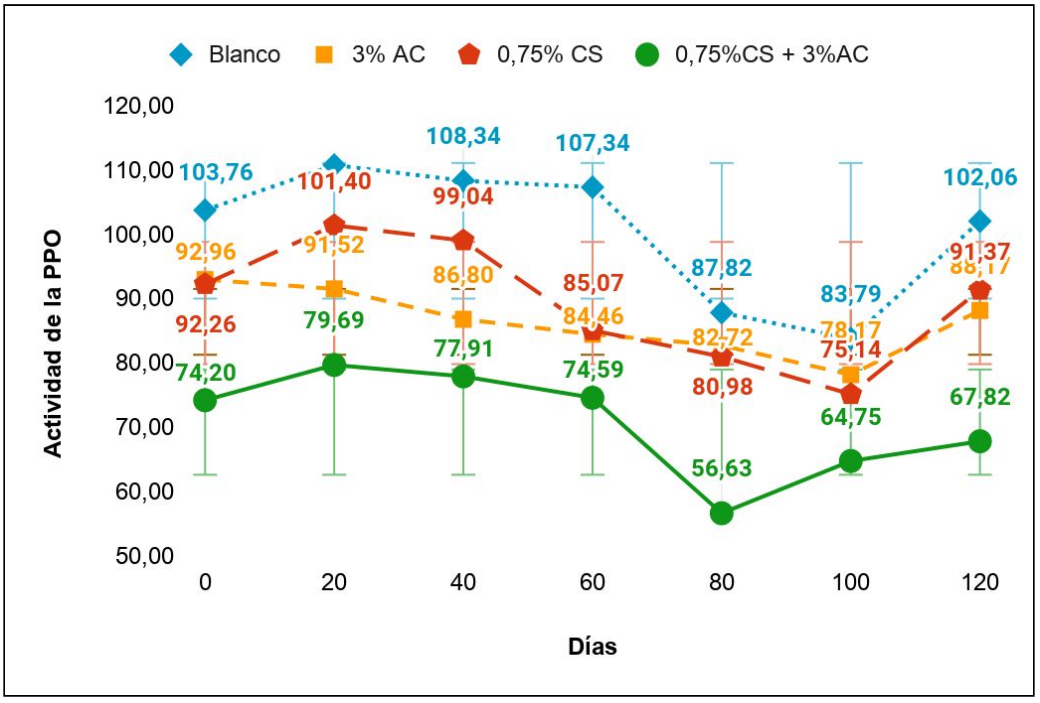


Figura 32. Variación de la actividad de la polifenoloxidasa con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

De forma notable, se puede apreciar de la Figura 32 las diferentes actividades de la PPO generada por los 4 tratamientos empleados, siendo el T_4 el que presentó la menor actividad enzimática durante toda la evaluación, seguidos por los tratamientos T_2 y T_3, donde dichos tratamientos obtuvieron similar comportamiento durante los 120 días de almacenamiento, sin embargo de forma contraria el tratamiento control (T_1) fue aquel que presentó en todo momento la mayor actividad. Según Friedman (1997) la actividad de la PPO provoca la oxidación de sustratos polifenólicos específicos a quinonas que se condensan con facilidad dando lugar a la formación de compuestos pardos llamados melaminas, siendo este el inicio del pardeamiento enzimático. De igual forma Friedman (1997) menciona que este fenómeno de oscurecimiento oxidativo es catalizada principalmente por la enzima polifenoloxidasa (PPO), convirtiendo los compuestos polifenólicos en quinonas altamente reactivas que luego forman pigmentos pardos indeseables en la pulpa. Según Rembado y Sceni (2009) la actividad enzimática refleja la velocidad de reacción en el que se da la formación de un determinado producto por unidad de tiempo. Esto nos lleva a inducir, que el tratamiento T_1 al poseer una elevada actividad enzimática en comparación con los demás tratamientos, presenta un rápido pardeamiento a causa de la mayor concentración de polímeros pardos producidos, este resultado se encuentra altamente relacionado con los cambios de color que se produce en la pulpa de la chirimoya (Figura 37) y la rápida oxidación de sus polifenoles (Figura 32) generando indeseables cambios sensoriales y nutricionales (Kobashigawa, 2018).

Jiang *et al*. (2016) afirman que una elevada actividad enzimática de la polifenoloxidasa puede afectar en la rapidez del pardeamiento de frutas que presentan concentraciones importantes de compuestos polifenólicos como la chirimoya. Por otro lado, Kobashigawa (2018) menciona que el desarrollo del fenómeno enzimático en la chirimoya puede ser

controlado mediante el uso de agentes antioxidantes, puesto que el uso de altas temperaturas producen sabores astringentes. Debido a su alto potencial y aplicación comercial que presenta la pulpa de chirimoya (Brito *et al*., 2008), se evaluó diferentes formulaciones aplicando soluciones de quitosano y ácido cítrico, debido a las propiedades que presentan como su capacidad antioxidante y quelante, además de estudiar una posible acción sinergista entre estos dos compuestos con la finalidad de conseguir un disminución en la actividad de la PPO causante del pardeamiento enzimático en la pulpa (Muñoz *et al*., 20014; Jiang *et al*., 2016).

De la Tabla 30 se puede apreciar una ligera disminución de la actividad de la PPO durante los primeros 60 días de evaluación, a excepción del tratamiento control (T_1) quien mostró para la segunda fecha de análisis, un incremento de la actividad enzimática, seguido de un descenso leve hasta el final de su almacenamiento. Campos *et al*., (2008) reportaron similar comportamiento, al observar una disminución de la actividad respecto a los días de análisis en chirimoyas frescas cortadas. Según Amiot *et al*. (1992) posiblemente esto se deba a la interdependencia que existe entre la oxidación de compuestos polifenólicos y la rápida formación de quinonas, existiendo una menor actividad enzimática a medida que los polifenoles son oxidados, tal y como se puede observar al comparar los resultados de la Figura 30 y 32. Esta interdependencia también es explicada por Coseteng y Lee (1987).

Tabla 30

Variación en la actividad de la PPO de la pulpa de chirimoya almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	103,76 ± 2,60	110,78 ± 4,50	108,34 ± 7,64	107,34 ± 6,56	87,82 ± 10,94	83,79 ± 1,83	102,06 ± 0,60
T_2 = **3%AC**	92,96 ± 7,60	91,52 ± 4,86	86,80 ± 1,66	84,46 ± 3,32	82,72 ± 2,00	78,17 ± 1,49	88,17 ± 3,62
T_3 = **0.75%CS**	92,26 ± 0,89	101,40 ± 1,54	99,04 ± 6,53	85,07 ± 2,80	80,98 ± 4,55	75,14 ± 0,87	91,37 ± 1,42
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	74,20 ± 4,92	79,69 ± 0,96	77,91 ± 3,35	74,59 ± 0,49	56,63 ± 3,35	64,75 ± 3,16	67,82 ± 2,68

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 2$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

La cuantificación específica de la actividad enzimática para cada fecha de evaluación se detalla en la Tabla 30, donde se observa que el tratamiento control registró una actividad promedio total de 100,56 Unidades de PPO/min x g de pulpa fresca durante los 120 días de almacenamiento. Seguidos por los tratamientos T_2 y T_3 el cual presentaron actividades promedios de 86,40 y 89,32 Unidades de PPO/min x g de muestra respectivamente. Mientras que el tratamiento T_4 reportó la menor actividad de la polifenoloxidasa, con un valor de 70,80 Unidades de PPO/min x g de muestra durante toda la evaluación, dejando en claro una posible acción sinérgica que ayude a controlar el pardeamiento enzimático, debido a una probable interacción entre el quitosano con el ácido cítrico.

Del tratamiento control se puede obtener la actividad de la PPO que presenta la chirimoya luego del proceso de pulpeado, el cual se puede considerar elevada a comparación a las actividades enzimáticas encontradas por otros investigadores, como Casado (2004)

quien caracterizó y cuantificó la polifenoloxidasa extraída del tomate, hallando una actividad promedio de 79,2 unidades de PPO/ min x g de muestra en fresco. Por otro lado, la actividad reportada experimentalmente resultó semejante a lo hallado por frutas que sufren notables daños producidos por el pardeamiento, como en el caso del banano o plátano estudiados por Gil *et al*. (2012), registrando una actividad de 102,93 unidades de PPO/min × ml de muestra. A Pesar que los productos originados por el pardeamiento enzimático no son tóxicos, existe un determinado rechazo a este fenómeno provocado por los cambios negativos que sufre sus propiedades sensoriales, fisicoquímicos y nutricionales, afectando considerablemente la comercialización o aplicación de la pulpa de chirimoya (Rembado y Sceni, 2009, Kobashigawa, 2018; Guerrero, 2009, Friedman, 1997).

La elevada actividad de la PPO hallada experimentalmente, se puede deber al desorden celular que se genera al recibir daños mecánicos propios del pulpeado, provocando un rompimiento celular que deja expuesto el contacto de la enzima con los polifenoles, dando inicio a la reacciones oxidativas propias del pardeamiento enzimático (Casado, 2004). Esta explicación se ve reforzada por Morante *et al*. (2014) el cual menciona que en los tejidos vegetales que no sufrieron ninguna lesión e impacto mecánico, los sustratos polifenólicos y la enzima polifenoloxidasa se encuentran en compartimentos diferentes, vacuola y cloroplasto respectivamente, por lo que no se evidencia ninguna reacción oxidativa, sin embargo procesamientos industriales de estas frutas como el triturado, cortado o pulpeado puede generar desorganizaciones celulares de estos compartimientos, permitiendo un contacto directo entre la enzima y los mismos compuestos fenólicos. Por esta razón, se recomienda no utilizar equipos como la licuadora industrial, el cual genera severos daños mecánicos a la estructura celular al momento del pulpeo de la fruta por existir un mayor rozamiento y corte producidos por la cuchillas del equipo. Así mismo, otro factor que puede ayudar a obtener un menor actividad enzimática, son las buenas prácticas agrícolas como la fertilización, la escasez de agua o riego, la temporada del cultivo y cosecha, en incluso al estrés salino del suelo entre otros factores más (Campos *et al*., 2008; Barberán & Espín, 2001).

Por otro lado, Martínez, Sánchez, Faus & Gil (1988) investigaron el efecto en la actividad enzimática de los monofenoles e dihidroxifenoles localizados en el epicarpio de la chirimoya, concluyendo que los diferentes sustratos empleados, así como la metodología seguida repercuten en la cuantificación de actividad de la PPO. Resultando complicado su comparación con otros autores que presenten diferente desarrollo metodológico para un mismo vegetal, sin embargo trabajar con las condiciones y procedimientos estandarizados podría arrojar resultados confiables respecto la actividad de una determinada enzima.

La Tabla 31 muestra el efecto significativo que se produce al utilizar diferentes tratamientos, para ello se realizó el análisis de varianza a partir de los resultados de la actividad enzimática. Pudiendo afirmar que con un nivel de confianza al 95%, se observa de forma notoria una diferencia significativa ($p < 0,0001$).

Ante el efecto estadístico encontrado, se realizó la comparación entre los tratamientos utilizando la prueba de Tukey, dicho resultado se observa en el Figura 33, el cual muestra una diferencia significativa entre todas las formulaciones (tratamientos), llegando ser el T_4 el que presentó en promedio la menor actividad enzimática a los 120 días de evaluación, seguidos por los tratamientos T_2 y T_3 donde no se encontró diferencia significativa entre ambos durante toda la etapa investigativa.

Tabla 31

Cuadro del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la actividad de la PPO

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Modelo	4609,78	9	512,20	28,72	<0,0001
Tratamiento	3162,50	3	1054,17	59,11	<0,0001
Bloque (Días)	1447,27	6	241,21	13,53	<0,0001
Error	321,01	18	17,83		
Total	4930,78	27			

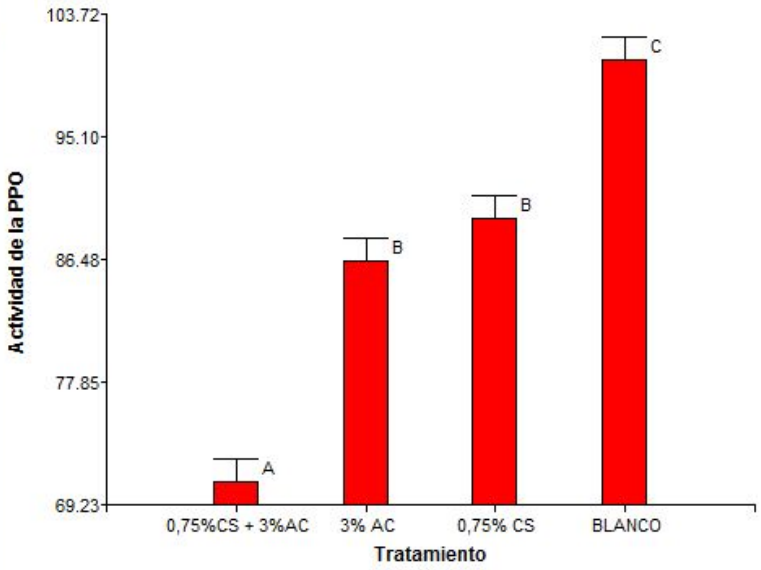


Figura 33. Comparación de la actividad de la PPO entre los tratamientos, luego de los 120 días en almacenamiento, según la prueba de Tukey.

El tratamiento control T_1, por su parte fue el que mayor actividad en promedio mostró viéndose afectado considerablemente por el pardeamiento enzimático al final de las evaluaciones.

Los resultados obtenidos en la Figura 33, muestra como al mejor tratamiento, la solución formulada por la combinación de quitosano (0,75%) con ácido cítrico (3,0%), evidenciando de esta forma algún modo de interacción o entrecruzamiento entre ambos compuestos el cual potencializan sus propiedades antioxidantes o quelante, obteniendo mejores resultados de

inhibición y control del pardeamiento enzimático en la pulpa de chirimoya comparados al emplear soluciones de quitosano o ácido cítrico independientemente (Chávez, Acevedo, Luzardo, Valbuena y Colina, 2018).

La disminución significativa en la actividad de la PPO tras aplicar una solución de ácido cítrico al 3% (tratamientos T_2 y T_4) se puede deber al efecto que produce los diferentes ácidos orgánicos en la reducción de la actividad enzimática cuyas concentraciones son mayores al 5 mM (Martínez *et al*., 1988). Debido a la capacidad acidulante que presenta el ácido cítrico, su aplicación en determinados productos, como la pulpa de chirimoya genera ciertos cambios en el valor de su *p*H (Muñoz *et al*., 2014; Papagianni, 2007). Es por ello, que se obtuvo una reducción experimental del *p*H (Tabla 24) a un valor promedio de 4,21 y 4,19 para los tratamientos T_2 y T_4 respectivamente. Rembado y Sceni (2009) afirman que entre las principales variables que pueden modificar la actividad de una determinada enzima es la variación del *p*H y la concentración iónica. Por otro lado, Cob, Tello, Escamilla, Vargas y Tamayo (2010) también indican el efecto que produce la variación del *p*H respecto a la disminución de la actividad enzimática, siendo la actividad reducida a valores de *p*H alrededor de 4.

Respecto a la baja actividad hallada en la pulpa de chirimoya para los tratamientos que presentan soluciones de quitosano como parte de su formulación (T_3 y T_4) probablemente se explique por las diferentes propiedades químicas que presenta el biopolímero. Kim & Thomas (2007) señalan que la actividad antioxidante del quitosano se debe a la capacidad que tiene para donar protones [H^+] procedente de sus grupos hidroxilo o amino. Estos hidrógenos activos reaccionan con moléculas de oxígeno (O_2) formando compuestos muy estables, siendo esta interacción influenciada por el peso molecular del quitosano (Tomida *et al*., 2010; Vinsova & Vavrikova, 2011). Una masa molar de 846 kDa obtenido para el quitosano de la pluma de pota produce un alto poder antioxidante, reduciendo la accesibilidad del O_2 a la pulpa de chirimoya, de esta manera se logra obtener un ligero control del pardeamiento enzimático como consecuencia a la menor actividad de la polifenoloxidasa producida.

Otras de la propiedades que brinda la aplicación de soluciones a base de quitosano, es la interacción que se genera entre los grupos amina e hidroxilo reactivos del polímero con iones metálicos como el Cu^{+2}, esta capacidad quelante del quitosano se ve afectada por la variación del *p*H modificando la densidad de carga del polímero (Gacén y Gacén, 1996; Mármol *et al*., 2011). Flores *et al*. (2005) por su parte mencionan que esta interacción se logra mediante un intercambio iónico entre el Cu^{+2} con el grupo NH_2 del quitosano.

El cobre (Cu) es un metal fundamental que forma parte del mecanismo de acción de la enzima polifenoloxidasa dando inicio a las reacciones de pardeamiento enzimático (Pérez, 2003). La PPO es considerada una metaloenzima puesto que presenta dos átomos de cobre como parte de su grupo prostético (centro activo) donde la formación de complejos con este metal podría inhibir de cierta manera la actividad de la polifenoloxidasa (Pérez, 2003; Pardo y Méndez, 2017). Por ello, los tratamientos T_3 y T_4 donde se involucró el uso de soluciones

de quitosano, se observa una disminución de la actividad enzimática, esto posiblemente a los quelatos formados producto de la interacción entre el biopolímero y el cobre.

La baja actividad de la PPO que se registró experimentalmente, también puede ser explicado por la propiedad que presenta el quitosano al ser un adecuado material de soporte para la inmovilización de enzimas, esto gracias a los diversos grupos funcionales que presenta en su composición química, logrando una interacción con enzimas que genera como consecuencia una disminución en su estabilidad operacional, aunque la inmovilización de la PPO puede estar ligado a la capacidad quelante que presenta el quitosano, convirtiéndose directamente en su inhibidor competitivo (Salazar *et al*., 2014; Bickerstaff, 1997).

A pesar de las diversas propiedades que brinda el quitosano y el ácido cítrico en el control del pardeamiento, existen investigaciones donde se estudia sobre un posible entrecruzamiento entre ambos compuestos, Chávez *et al*. (2018) mencionan que esta reacción de entrecruzamiento se puede dar mediante una amidación o esterificación. Wade (2012) por su parte explica las propiedades que presenta los ácidos carboxílicos (ácido cítrico) en formar derivados mediante enlaces amida y éster. El entrecruzamiento por esterificación se obtiene mediante un enlace entre los grupos hidroxilos del quitosano y ácido cítrico, mientras que la reacción de amidación se logra mediante un enlace producido entre el grupo amino del quitosano con el grupo carboxílico del ácido cítrico, formando un enlace amida luego de recibir calor (Reddy & Yang, 2009; Wade, 2012; Chávez *et al*., 2018). El tratamiento T_4 cuya formulación esta compuesta por una solución de quitosano y ácido cítrico, fue agitada durante 4 h a 70° C, lo que posibilita, a esta temperatura, se produzca un entrecruzamiento entre estos dos compuestos mediante enlaces amida (amidación) tal y como lo explica Wade (2012). La N-acetilcisteína cuya estructura química también presenta el enlace amida (NH), es utilizado como un agente antipardeante muy efectivo, sin embargo su aplicación a concentraciones necesarias para reducir la actividad de la PPO produce cambios en el sabor del producto (Ashie *et al*., 1996; Morante *et al*., 2014).

Probablemente el efecto sinérgico encontrado para el T_4 se debe a la presencia de estos 4 enlaces amidas que provocan el entrecruzamiento entre el quitosano y el ácido cítrico, esto se ve reforzado por la investigación realizada por Avila *et al*. (2010), el cual elaboraron películas a base de quitosano con sorbato de potasio, en su estudio se observó la presencia de una enlace amida entre ambos compuestos ayudó a conseguir una mayor reducción de la melanosis o pardeamiento del langostino.

Finalmente se puede llegar a concluir y evidenciar a partir de los resultados obtenidos, un mayor retraso del pardeamiento enzimático producido por la interacción entre el quitosano y ácido cítrico a diferencia del menor efecto logrado por cada uno de los compuestos de forma independiente. Según Córdoba y Hernández (1998) estaríamos ante una posible sinergia de potenciación, debido a que un determinado agente B (quitosano) consigue un mayor efecto ante un evento definido provocado por el agente A (ácido cítrico), que a diferencia del sinergismo aditivo, los autores mencionan que el efecto beneficioso se podría lograr

aumentando la dosis o concentración de algunos de los dos agentes, siendo esta última en farmacología una práctica antigua y en desuso.

Por otro lado, Heras (2017), investigadora responsable de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la Universidad Complutense de Madrid, señala que durante la actualidad el biopolímero del quitosano ha tomado mayor protagonismo. A partir del 2015 la búsqueda e investigación de acciones sinérgicas entre el quitosano y diferentes residuos agroindustriales, han tenido como finalidad conseguir compuestos funcionales aplicativos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

La tendencia en investigación a nivel internacional que presenta este biopolímero conlleva a realizar mayores estudios continuamente. Tal es el caso del presente trabajo de investigación, que servirá de aporte al entendimiento de la sinergia producida entre el quitosano y el ácido cítrico aplicado en la pulpa de chirimoya donde dicho objetivo alcanzado fue la de retardar el pardeamiento enzimático.

4.4.5. Color.

La Figura 34 muestra los cambios producidos del parámetro L* (Luminosidad) durante los 120 días de evaluación. Donde de forma clara se aprecia una curva descendente en todos los tratamientos empleados. Siendo el T_4 (solución de CS + AC) el que desarrolló un menor cambio, seguido por el T_2 (solución de AC) donde se logra observar una mayor variación. Mientras que los tratamientos T_1 (Control) y T_3 (solución de CS) mostraron curvas descendentes similares, producto de la mayor pérdida de luminosidad durante la evaluación.

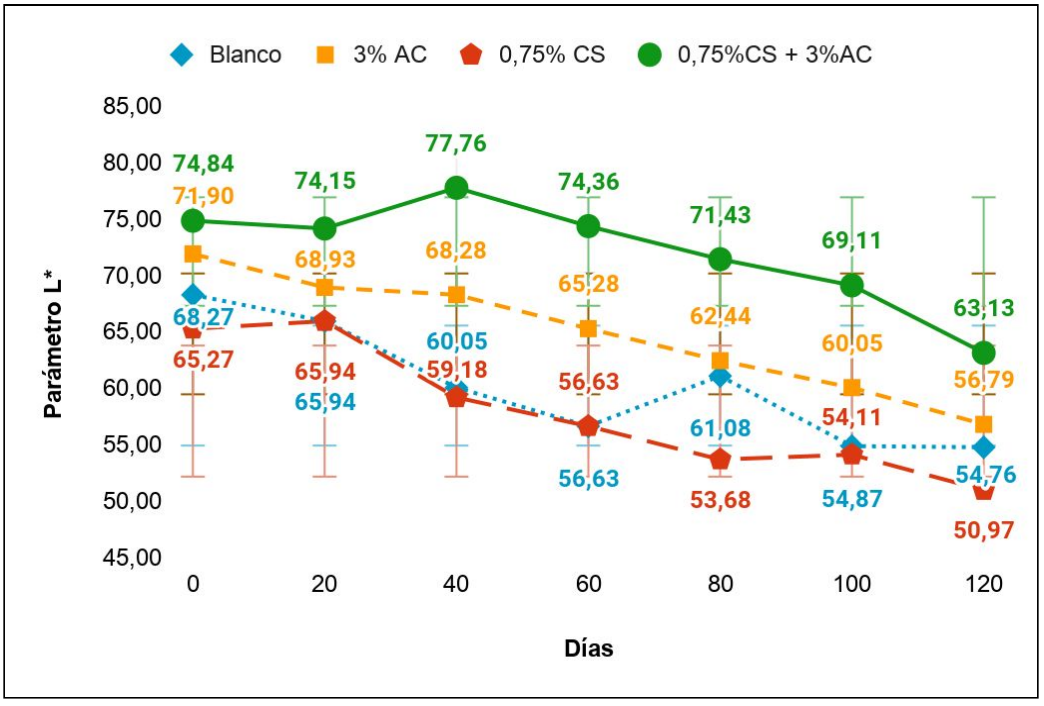


Figura 34. Variación del parámetro L* con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

Para Cabañas (2017) y Clydesdale (1993) el color de un producto alimenticio es un factor importante, provocando en el consumidor distintos comportamientos que van desde el rechazo hasta la aceptación. Un mayor entendimiento sobre el análisis de color, se logra mediante las coordenadas L*, a* y b* pertenecientes al sistema CIE-Lab, cuyos parámetros son utilizados como indicadores de la variación del color (ΔE) en determinadas muestras (López y Di Sarli, 2016). Con anterioridad se observó el posible efecto sinergista entre los compuestos de ácido cítrico y quitosano, ofreciendo un mayor control del pardeamiento enzimático debido a la menor actividad de la PPO conseguido. Ahora se discutirá la posible relación que existe entre la variación del color producidos en la pulpa de chirimoya con la rapidez del pardeamiento además de la posible interdependencia con su actividad enzimática.

Robledo (2007) en su trabajo de investigación evaluó el efecto producido por la adición de diferentes aditivos en el control del pardeamiento enzimático de la pulpa de chirimoya mínimamente procesada, obteniendo similar comportamiento a lo observado en la Figura 34. Por otro lado, Martínez *et al*. (1993) afirma que el valor del parámetro L* muestra una adecuada correlación con el oscurecimiento oxidativo en la pulpa de chirimoya. Esta misma tendencia se puede presenciar en vegetales altamente sensibles a sufrir daños por oxidación enzimática, Hernández y Briceño (2009) evaluaron el pardeamiento ocurrido en puré de palta almacenada a temperatura de congelación, donde se observó una reducción de la luminosidad durante los 150 días de evaluación. De igual forma Sepúlveda (2010) encontró disminuciones en el valor de L* en los cascos de pera peladas. Para Pérez (2003) esta pérdida de L* involucra una disminución de la claridad del fruto y aumento de oscuridad, es por ello que este parámetro es frecuentemente utilizado como indicador de la rapidez del pardeamiento.

Por otra parte, Cabañas (2017) menciona la influencia de la temperatura en el color durante el pardeamiento enzimático producido en rodajas de manzanas, encontrando una menor disminución de la luminosidad para muestras escaldadas a 40° C. Esto posiblemente se deba al tratamiento térmico al que fue sometido las manzanas antes de su almacenamiento el cual genera la inactivación de la PPO mediante la desnaturalización de la enzima, reduciendo considerablemente su actividad (Damodaran, Parkin y Fennema, 2010). Sin embargo, la inhibición del pardeamiento oxidativo que sufre la chirimoya se ve limitada por los proceso térmicos, ya que su uso podría liberar compuestos polifenólicos (taninos), generando sabores astringentes o amargos en la pulpa además de conseguir un rápido pardeamiento (Kobashigawa, 2018).

Apai *et al*. (2009) analizaron el efecto beneficioso que puede generar la combinación entre el quitosano y ácido cítrico en los cambios de color producidos en frutas frescas de longan como consecuencia al pardeamiento enzimático, donde se observó una menor reducción del parámetro L* de la fruta para el tratamiento cuya formulación estaba conformada por la mezcla de ambos compuestos de interés, de esta forma se comprueba la acción sinérgica encontrada experimentalmente, existiendo una mayor inhibición de la enzima polifenoloxidasa el cual se evidencia con la menor actividad enzimática registrado.

Esta teoría se ve reforzada por las investigaciones realizadas por Son, Moon & Lee (2000) y Pérez (2003) donde afirman que la combinación simultánea de diferentes agentes pueden inducir un mecanismo de acción sinergista, provocando ciertos cambios como la disminución del *p*H, cambios en el centro activo de la enzima PPO e inclusive la formación de reacciones competitivas entre enzima y sustrato.

Los cambios del parámetro a* producidos en la pulpa de chirimoya se especifican en la Figura 35, donde se aprecia un ligero aumento en todos los tratamientos de estudio respecto a los días de almacenamiento, siendo el tratamiento control (T_1) el que presentó mayor incremento de este indicador, seguido del T_3 quien mostró una menor variación comparado con el control, mientras que los tratamientos T_2 y T_4 se comportaron de forma muy similar durante la evaluación. Butta & Abbott (2000) menciona que el aumento del valor a* estaría relacionado con el avance del pardeamiento enzimático. Puesto que las coordenadas del eje a* para el sistema CIE-Lab indican una variación del color verde (valores negativos de a*) al color rojo (valores positivos de a*). Por ende, los resultados obtenidos indicarían que existen cambios en el color propio de la pulpa de chirimoya a un tono rojizo suave, esto posiblemente por la formación de melaminas, el cual toma un color pardo, luego de pasar por una variedad de colores que van entre el rojo y rosado (Bello, 2012; López y Di Sarli, 2016).

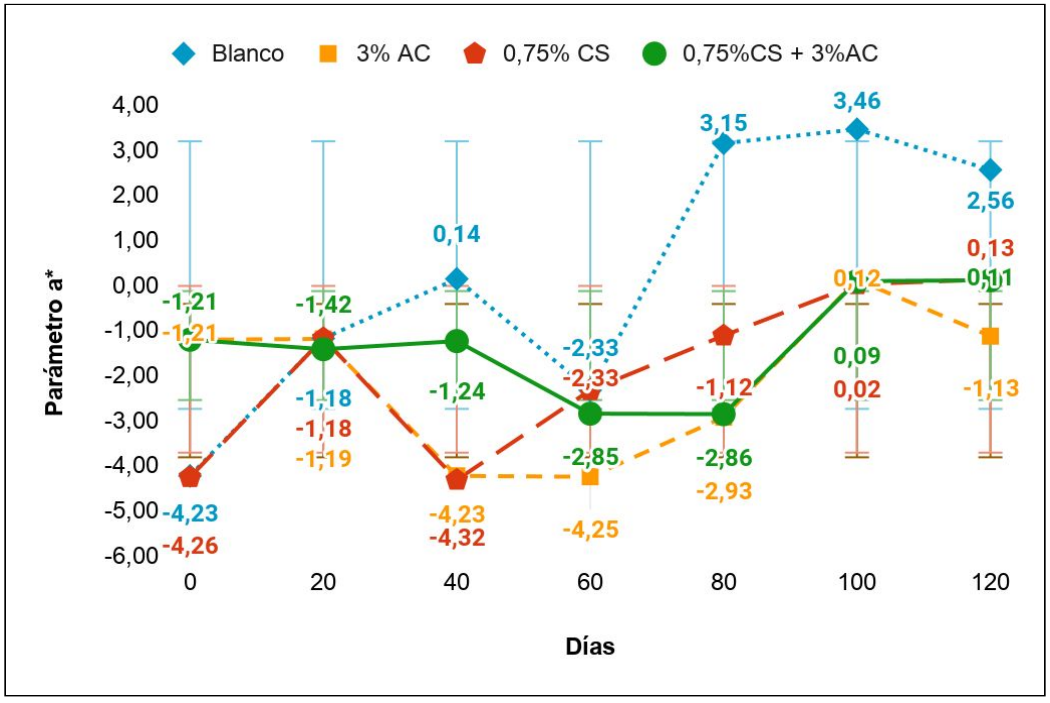


Figura 35. Variación del parámetro a* con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

Butta & Abbott (2000), Cortés y Chiralt (2008) reportaron comportamiento similares, al observar un incremento del parámetro a* al transcurrir los días de almacenamiento en peras cortadas y manzanas deshidratadas respectivamente. Asimismo, Robledo (2007) evidenció un aumento del indicador a* respecto al avance del oscurecimiento enzimático en chirimoyas mínimamente procesadas. La baja actividad de la polifenoloxidasa conseguida por la

aplicación sinérgica entre el quitosano y ácido cítrico (T_4) genera como consecuencia una menor oxidación de los compuestos polifenólicos presente en la pulpa de chirimoya, logrando una menor formación de polímeros pardos el cual se puede apreciar al no evidenciar grandes cambios respecto al parámetro a* (Friedman, 1997). Mientras que la poca variación del valor a* en el tratamiento (T_2) se puede deber a disminución del *p*H de la pulpa consiguiendo una menor actividad enzimática (Chahuayo, 2014; Silveira, 2017; Morante *et al*., 2014).

Finalmente, otra de las coordenadas del sistema CIE-Lab el cual es utilizado para el cálculo de la variación del color (ΔE), es el eje b* el cual refleja cambios del color amarillo (valores positivos de b) al color azul (valores negativos de b) (López y Di Sarli, 2016). La Figura 36 muestra esta variación respecto a los cambios producidos del indicador b* durante los 120 días de evaluación. Siendo el tratamiento T_4 (solución de quitosano al 0,75% y ácido cítrico al 3%) el que consiguió una mayor estabilidad del parámetro b*, a diferencia del T_2 (solución de ácido cítrico al 3%) el cual mostró un ligero aumento de este valor. Mientras que los tratamientos T_3 (solución de quitosano) y T_1 (control) presentaron mayores aumentos respecto a este parámetro siendo un incremento considerable para T_3 a partir del día 100 de almacenamiento.

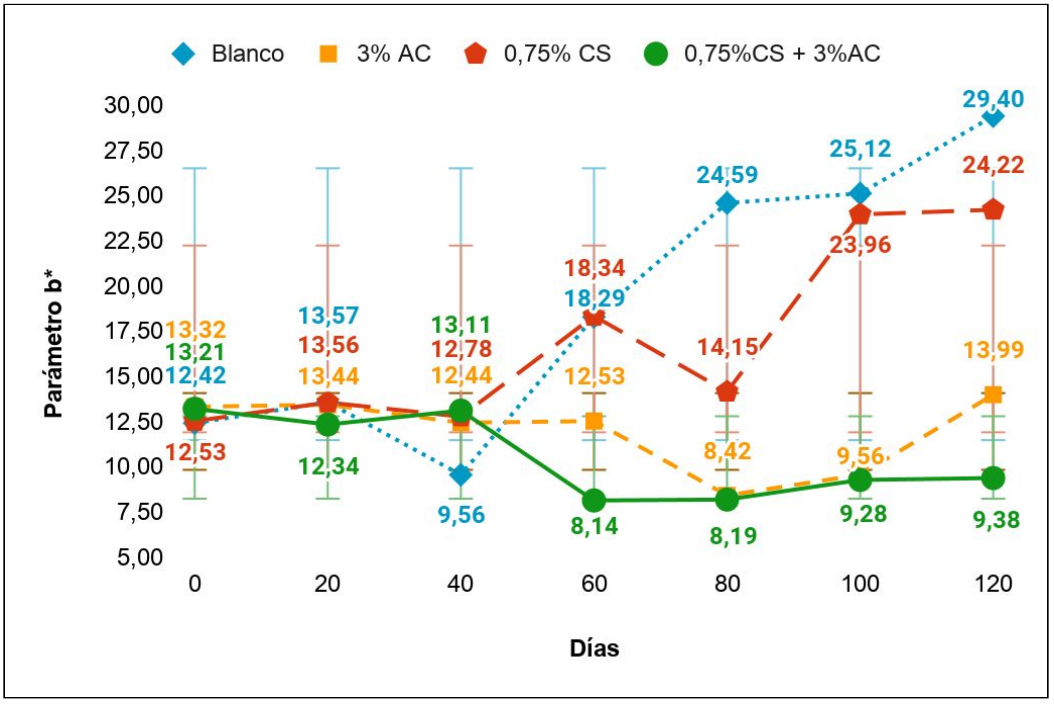


Figura 36. Variación del parámetro b* con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

En chirimoyas se evidencio un incremento del valor b* para el sistema CIE-Lab, indicando que el intenso aumento de este parámetro estaría relacionado con el rápido pardeamiento de la fruta (Robledo, 2007; Campos *et al*., 2008). De igual forma, estudios realizados en otros frutos como lo expuesto por Izquierdo y Villanueva (2018) reportan un incremento del color amarillo en pulpa de palta tratada con ácido ascórbico.

Posiblemente el mayor aumento del indicador b* producido en el tratamiento control, se explique por la rápida oxidación de compuestos fenólicos presente en la pulpa de chirimoya, el cual se encuentra altamente relacionado con la elevada actividad de la polifenoloxidasa registrada, generando productos de color pardo, favoreciendo de esta manera el incremento del color amarillo (García *et al*., 2015). A diferencia del tratamiento T_4, donde la probable sinergia entre el quitosano y ácido cítrico, ayuden a controlar el pardeamiento de la fruta, obteniendo una menor variación del indicador b* (Avila *et al*., 2010).

Respecto a la cuantificación de los cambios de color (ΔE) producidos en la pulpa de chirimoya durante su almacenamiento, se registraron los valores obtenidos en la Figura 37. Esta variación (ΔE) se determinó siguiendo la metodología planteada por López y Di Sarli (2016), donde todos los resultados se obtuvieron para los 4 tratamientos de estudio y su cálculo se realizó en base a la ecuación especificada por la norma europea EN 12878 tomando en cuenta el sistema CIE-lab.

De la Figura 37 se observa que todos los tratamientos presentaron un similar comportamiento respecto a la cambios del color producidos en la pulpa de chirimoya, obteniendo rectas de pendientes positivas cuyas correlaciones lineales fueron adecuadas.

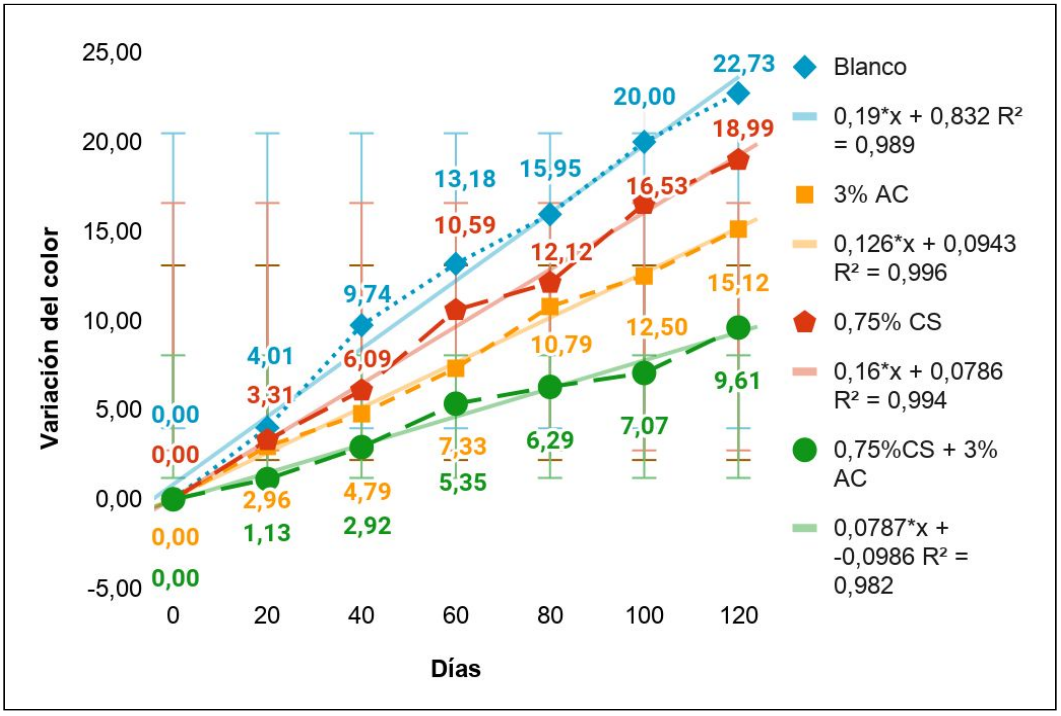


Figura 37. Variación del color con respecto a los días de almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

El tratamiento T_4 cuya formulación está compuesta por la combinación entre el quitosano y ácido cítrico presentando una correlación lineal de ($R^2 = 0{,}982$) que mostró los menores cambios de color durante toda la evaluación. Seguidos por lo tratamientos donde se involucra agentes antioxidantes de forma independiente, siendo el T_3 ($R^2 = 0{,}994$) que presentó una recta más pronunciada a comparación del T_2 ($R^2 = 0{,}996$) indicando que existe una mayor variación del color en la pulpa que contenía una solución de quitosano (0,75%) en

comparación a la tratada con ácido cítrico (3%). Por otro lado, el tratamiento control (T_1) con un $R^2 = 0{,}989$ registró el mayor cambio respecto al color inicial de la pulpa, que según la FAO (2006) esta presenta un color blanco cremoso.

Similar incrementos en la diferencia de color fueron registrados en los estudios realizado por Alberto (2009) donde se evaluó los cambios de color producidos en el plátano tratados con agentes antipardeantes (ácido ascórbico y isoespintanol).

Los resultados obtenidos de forma experimental, podrían ser explicados por el fenómeno del pardeamiento enzimático ocurrido en la pulpa de chirimoya, el cual produce quinonas mediante la oxidación de compuestos polifenólicos presentes en la pulpa, formando un conjunto de pigmentos oscuros (pardos) que inducen a la variación del color de la pulpa (Friedman, 1997).

Los cálculos específicos de la variación del color (ΔE) se detallan en la siguiente Tabla 32. Donde se logra apreciar que el tratamiento control (T_1) muestra una diferencia total de 22,73 para los días 120 y 0 de evaluación, siendo este resultado el que mayor variación del color presentó durante el almacenamiento de la pulpa, probablemente el rápido cambio de color se encuentra relacionado con la alta actividad de la polifenoloxidasa registrada para la pulpa de chirimoya que no presenta la adición de algún agente antipardeante. Morales (2015) afirma que el rápido pardeamiento que sufre la chirimoya dificulta su industrialización, debido a la pérdida de la calidad y propiedades sensoriales, siendo finalmente rechazados por los consumidores. Además una elevada actividad de la polifenoloxidasa permite la rápida formación de polímeros pardos (melaminas), el cual otorga el color negativo característico de una pulpa oxidada (Rembado y Sceni, 2009). De forma antagónica el tratamiento cuya formulación presenta la mezcla entre la solución de quitosano y ácido cítrico (T_4) mostró la menor variación total del color (ΔE), siendo esta diferencia de 9,61 entre el primer y último día de evaluación. El posible efecto sinérgico entre ambos compuestos de estudio, generó una disminución en la actividad de la polifenoloxidasa, generando en consecuencia una lenta degradación oxidativa de los compuestos fenólicos de la fruta, esto evidenciaría un menor pardeamiento enzimático de la pulpa, dejando en claro la estrecha relación entre el cambio del color y el oscurecimiento enzimático oxidativo (Morante *et al*., 2014; Amiot *et al*., 1992; García *et al*., 2015). Por otra parte, los tratamientos T_2 y T_3 en donde se involucra la adición de soluciones independientes de ácido cítrico y quitosano respectivamente, consiguieron menores cambios del color comparados con el control (T_1), pero mayor a la variación obtenida por el T_4. Siendo esta diferencia total de 15,12 y 18,99 para la pulpa tratada con solución de ácido cítrico y quitosano respectivamente.

Tabla 32

Variación del color (ΔE) en la pulpa de chirimoya almacenada durante 120 días a -20° C

	Días						
Tratamientos	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**120**
T_1 = **Blanco**	0,00 ± 0,01	4,01 ± 0,01	9,74 ± 0,02	13,18 ± 0,02	15,95 ± 0,03	20,0 ± 0,01	22,73 ± 0,02
T_2 = **3%AC**	0,00 ± 0,01	2,96 ± 0,01	4,79 ± 0,02	7,33 ± 0,01	10,79 ± 0,02	12,5 ± 0,01	15,12 ± 0,01
T_3 = **0.75%CS**	0,00 ± 0,00	3,31 ± 0,01	6,09 ± 0,01	10,59 ± 0,03	12,12 ± 0,02	16,53 ± 0,01	18,99 ± 0,01
T_4 = **0,75%CS + 3%AC**	0,00 ± 0,01	1,13 ± 0,01	2,92 ± 0,02	5,35 ± 0,03	6,29 ± 0,01	7,07 ± 0,01	9,61 ± 0,02

Nota: Las mediciones durante la experiencia se realizaron por triplicado ($n = 3$) donde los valores luego del signo ± indica la desviación estándar.

Con los resultados calculados de la variación del color (Δ E) se realizó un análisis de varianza, esto con la finalidad de evaluar el posible efecto significativo producido por los diferentes tratamientos empleados en relación a los cambios de color que se genera en la pulpa de chirimoya al transcurrir el tiempo de almacenamiento.

La Tabla 33 muestra este análisis estadístico, donde se logra apreciar con un nivel de confianza del 95%, existe una clara diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,0001$), reafirmando el efecto conseguido por el quitosano y ácido cítrico en el retraso del pardeamiento.

Tabla 33

Cuadro del análisis de la varianza para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la variación del color (ΔE)

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadrados medios**	**F**	**p-valor**
Modelo	1078,92	9	119,88	25,98	<0,0001
Tratamiento	217,10	3	72,37	15,68	<0,0001
Bloque (Días)	861,82	6	143,64	31,13	<0,0001
Error	83,05	18	4,61		
Total	1161,97	27			

Debido al efecto significativo encontrado en los tratamientos, se realizó una comparación entre ellas mediante la prueba de Tukey, dichos resultados se detallan en la Figura 38. De forma notoria se observa diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos siendo el T_4 el que mejores resultados brindó, debido a que generó pocos cambios en el color de la pulpa, dando a entender el impacto beneficioso del entrecruzamiento entre ambos compuestos en el control del pardeamiento enzimático (Avila *et al*., 2010).

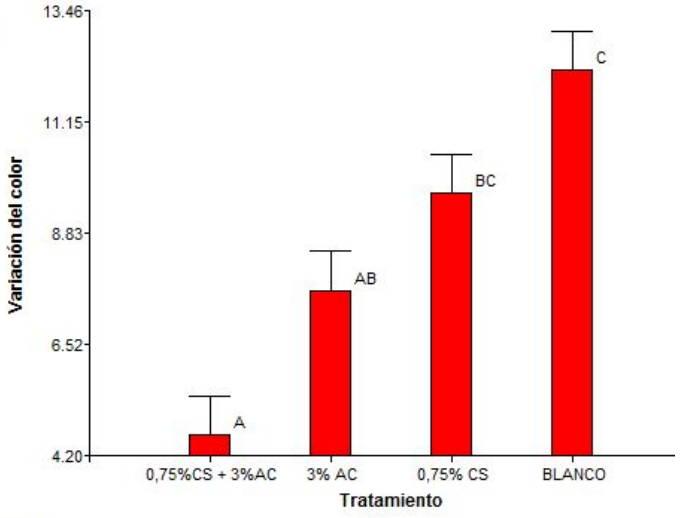


Figura 38. Comparación de la variación del color entre los tratamientos, luego de los 120 días en almacenamiento, según la prueba de Tukey.

Ante la actual problemática que existe en la oxidación enzimática de la chirimoya causada por la polifenoloxidasa cuando la fruta es procesada (Ibáñez *et al*, 2003; Suárez, 2009) y a los escasos trabajos de investigaciones realizados para contrarrestar el fenómeno de oscurecimiento en pulpa de chirimoya, se realizó un análisis de la cinética química, donde se observa estudios relacionados con la diferencia del color en diversas frutas han sido de interés en los últimos años debido a su relación con la pérdida de la calidad sensorial de los alimentos (Manayay, Ibarz, Castillo y Palacios, 2013). Simultáneamente se debe tener en conocimiento en base a lo establecido por Braverman (1980) que el pardeamiento ocurrido en diversas frutas durante el almacenamiento no solo son causadas por enzimas oxidativas, sino también se debe a un conjunto de fenómenos químicos que genera el oscurecimiento de vegetales, tales como reacciones de maillard, condensaciones de melanoidinas, la oxidación del ácido ascórbico, entre otros, provocando cambios en el color inicial característico de la fruta a una tonalidad parda e indeseable, siendo estos importantes indicadores de la vida útil en alimentos y productos procesados como la pulpa. La investigación realizada por Ibarz, Casero, Miguelsanz y Pagan (1989) dejan abierta la posibilidad de aplicar la ecuación de Arrhenius en curvas o rectas que presenten un modelo cinético de primer orden u orden cero, esto debido al evaluar la rapidez del pardeamiento no enzimático a diferentes temperaturas encontraron con un alto nivel de confianza (99%) una variación lineal del color en zumos de frutas. Ante la similitud de los resultados y la elevada correlación lineal para cada una de los tratamientos, existe la probabilidad de pronosticar el tiempo de vida útil, en función a los cambios de color que se produce en la pulpa durante el almacenamiento, siendo este valor un parámetro importante, por ser considerado un indicador de pérdida de la calidad sensorial (Friedman, 1997).

El Anexo 24 muestra imágenes del avance del oscurecimiento oxidativo durante las fechas de evaluación, siendo el tratamiento control el que mostró a los 100 días de almacenamiento un cambio de color ($\Delta E = 20$) en el que se consideró un pardeamiento de la

pulpa perceptible por el ojo humano, siendo muy probable su rechazo por parte del consumidor. Cabe resaltar que la estimación de vida útil resulta menor a lo planteado por el SIICEX, debido a las condiciones de congelado, obteniendo una duración de 360 días utilizando la congelación IQF. En base a la ecuación de Arrhenius planteada por Manayay *et al*. (2013) muestran el siguiente modelo: $\Delta E = \Delta E^* + KT$ el cual obedece a la cinética de la variación del color. Para la estimación de vida útil de los diferentes tratamientos, se tomó como índice final de calidad la diferencia del color conseguido por el tratamiento control hasta el día 100 ($\Delta E = 20$). La pulpa de chirimoya tratada con solución de quitosano (T_3) se pronostica una vida útil de 125 días según el modelo cinético que lo rige ($\Delta E = 0{,}16 + 0{,}0786$ T), mientras que para el T_2 (solución de ácido cítrico) la ecuación que sigue ($\Delta E = 0{,}126 + 0{,}0943$ T) predice una duración de 158 días de almacenamiento en las mismas condiciones. Sin embargo el tratamiento T_4, con un modelo cinético de $\Delta E = 0{,}0787 + 0{,}0986$ T, lograría un tiempo de vida aproximado de 254 días en almacenamiento (-20° C), concluyendo en base a todos los resultados mostrados el tratamiento T_4 el que produjo control del pardeamiento enzimático.

4.5. Análisis microbiológico en la pulpa de chirimoya

La Tabla 34 muestra los agentes microbiológicos tomados en cuenta según la NTS N°071 donde se precisa, para frutas frescas semiprocesadas en congelación, análisis de *Aerobios mesófilos, Escherichia Coli, Salmonella sp* y *Listeria Monocytogenes*.

Tabla 34
Evaluación microbiológico de la pulpa de chirimoya

Criterio microbiológico	Resultado
Aerobios mesófilos (UFC/g T)	< 25 x 10
Escherichia Coli (NMP/g)	< 3,00
Listeria Monocytogenes (/25 g)	Ausencia
Salmonella sp. (/25 g)	Ausencia

La evaluación microbiológica de la pulpa de chirimoya se llevó a cabo luego de haber culminado su estudio, el cual tomó 120 días de evaluación. Este análisis microbiológico se realizó a la pulpa de chirimoya que fue tratada con la adición conjunta de quitosano y ácido cítrico, debido a los óptimos resultados que mostró esta formulación (T_4) en el control del pardeamiento enzimático. El Minsa a través del Digesa establece la Norma Sanitaria NTS N°071 MINSA/DIGESA - V.01., 2003, en base a los criterios microbiológicos de calidad para alimentos y bebidas de consumo humano, esto con la finalidad de garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos que son predestinados al consumo humano. Todos los resultados obtenidos se encuentran por debajo de lo permitido por la norma establecida por Digesa (2003). Esto posiblemente al efecto antimicrobiano que presenta el quitosano (Rodríguez *et al*., 2009). Valencia (2015) asegura que la capacidad antimicrobiana que presenta este

biopolímero, se debe a la presencia de la carga positiva que presenta sus grupos amino cuando se encuentra en soluciones de *p*H inferiores a 6,3; esto hace posible una interacción con la pared celular microbiana de carga negativa, generando alteraciones de diferentes compuestos intracelulares debido a la ruptura de la pared microbiana.

Finalmente se evidencia de los resultados microbiológicos obtenidos, la adecuada aplicación de las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) mediante la manipulación de la fruta, además de reafirmar las condiciones asépticas de trabajo en el que se realizó el proceso de pulpeado, asegurando la calidad sanitaria de la pulpa. En relación a los estudios toxicológicos del quitosano, Ayala (2015) afirma una biocompatibilidad del polímero con los humanos, considerado no tóxico al no ser posible su digestión. Aranaz *et al.* (2009) por su parte, señala la capacidad antimicrobiana y las diferentes propiedades que brinda el quitosano, llevó a la aplicación alimentaria en países como Japón, Italia y Filipinas. Respecto al ácido cítrico su uso en alimentos se encuentra regulado por la Norma General del Codex Alimentarius (GSFA) cuyo valor empleado en la formulación se encuentra por debajo del máximo permitido para pulpa de frutas.

5. CONCLUSIONES

5.1. El quitosano, extraído a partir de la pluma de pota, empleado como aditivo en la presente investigación ostenta las siguientes características físicas y químicas: 10,52% de humedad; 0,35% de cenizas; 602 mL/g de viscosidad; 846 kDa de peso molecular y 78,2% del grado de desacetilación.

5.2. La chirimoya de variedad Lisa es la mejor, debido a que, obtuvo un 70,07%; 3,10% y 26,31% en rendimiento adecuado de pulpa, pepa y cáscara respectivamente, mientras la variedad Impresa, presentó un rendimiento inferior de 63,74%; 7,16% y 28,65% para las mismas evaluaciones.

5.3. Los parámetros fisicoquímicos, obtenidos para la chirimoya de variedad Lisa, fueron 4,56 de *p*H; 0,30 mEq-g de ácido cítrico/100 g de peso en la pulpa fresca de acidez titulable; 19,80 °Brix de sólidos solubles totales y 218,03 mg de ácido gálico/100 g de pulpa en fresco en contenido de polifenoles totales, minimizando la aparición de variables intervinientes en los resultados.

5.4. La chirimoya de variedad Lisa, evaluada en el proyecto de investigación presenta las siguientes características físicas: 287,74 g de peso; 10,31 cm de largo; 11,84 cm de diámetro y 295,2 ml de volumen, además de una composición proximal, expresada en g/100 g de pulpa fresca, muestra un 73,6% de humedad; 1,6% de proteínas, 0,3% de grasas, 22,6% de carbohidratos, 1,1% de fibra cruda y 0,8% de cenizas.

5.5. El tratamiento de quitosano 0,75% y ácido cítrico 3% (T_4) es el mejor, porque presentó la menor variación en el contenido de polifenoles totales, actividad de la enzima polifenoloxidasa y cambios de color, registrando valores de 28 mg de ácido gálico/100g de pulpa en fresco, 70,80 Unidades de PPO/min x g de muestra y 9,61 de variación total respectivamente.

5.6. Los estudios cinéticos proyectan un tiempo de vida útil, para el tratamiento T_4, hasta 254 días en almacenamiento a -20° C, siendo apropiado para escala a nivel industrial.

5.7. La formulación T_4 demostró el control del pardeamiento enzimático en la pulpa de chirimoya, consecuencia de una acción sinérgica entre el quitosano y ácido cítrico.

6. RECOMENDACIONES

6.1. Emplear una pulpeadora para reducir el daño en la estructura interna celular de la chirimoya, disminuyendo la exposición directa entre los sustratos polifenólicos contenidos en los cloroplastos y/o vacuolas con la enzima polifenoloxidasa causante del pardeamiento enzimático.

6.2. Implementar, en la línea de proceso, el congelado industrial IQF para obtener una congelación rápida, retrasando los cambios químicos producidos inmediatamente después del pulpeado.

6.3. Utilizar un envasado al vacío para mejorar e incrementar considerablemente el tiempo de vida útil conseguido en esta investigación.

6.4. Informar los resultados obtenidos en esta investigación a productores de chirimoya y autoridades competentes para implementar laboratorios de investigación y plantas agroindustriales que ayudarán a impulsar el desarrollo socioeconómico de la zona.

6.5. Impulsar nuevos productos al mercado, tales como helado, yogurt, mermelada, entre otros a base de la pulpa de chirimoya tratada con la formulación de quitosano y ácido cítrico.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Agraria de Noticias. (15 de agosto de 2016). *Productores de Huarochirí exportan 1.600 kilos de chirimoya a Hong kong y Canadá* [Boletín diario de noticias]. Recuperado de https://agraria.pe/noticias/productores-de-huarochiri-exportan-1600-kilos-11796

Agencia Agraria de Noticias. (28 de mayo de 2015). *Perú produce 20 mil toneladas de chirimoya al año* [Boletín diario de noticias]. Recuperado de https://agraria.pe/noticias/peru-produce-20-mil-toneladas-de-chirimoya-al-ano-8346

Agustí, M. (2004). *Fruticultura*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.

Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol, 7*, 179–186.

Alberto, B. (2009). *Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico* (tesis de postgrado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Alique, R. (1995). Residual effects of short-term treatments with high CO2 on the ripening of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Journal of Horticultural Science, 70* (4), 609-615.

Álvarez, G. (2009). *La ciencia de los alimentos y el pardeamiento enzimático* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

Amiot, M., Tacchini, M., Aubert, S., y Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of food science,* 57 (4), 958-962.

Anand, M., Kalaivani, R., Muruthupandy, M., Kumaraguru, A., y Suresh, S. (2014). Extraction and Characterization of Chitosan from Marine Crab and Squilla Collected from the Gulf of Mannar Region, South India. *Journal of Chitin and Chitosan Science, 2* (2), 1-8.

Apai, W., Sardsud, V., Boonprasom, P., y Sardsud, U. (2009). Effects of chitosan and citric acid on pericarp browning and polyphenol oxidase activity of longan fruit. *Songklanakarin Journal Science Technology, 31* (6), 621-628.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., y Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical Biology*, *3*,203-230.

Arun, B., Venkatesh, K., Chakrapani, P., y Roja, A. (2011). Phytochemical and Pharmacological potential of Annona cherimola-A Review. *International Journal of Phytomedicine, 3*, 439-447.

Ashie, I., Simpson, B., y Smith, J. (1996). Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition, 36* (1-2), 1-30.

Avila, A., Costamagna, V., Barrientos, E., Pucci, G., Sánchez, E., y Strumia, M. (2010). Películas de quitosano con sorbato de potasio unido física y covalentemente. estudios de aplicación. *Revista iberoamericana de polímeros, 11* (2), 73 - 87.

Ayala, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria, 2*, 32 - 38.

Balanta, D., Grande, C., y Zuluaga, F. (2010). Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de aspergillus niger y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. *Revista iberoamericana de polímeros, 11* (5), 297 - 316.

Balboa, O. (2011). *Producción de pulpa de chirimoya (Annona cherimola* Mill.*) en la localidad de Comarapa Santa Cruz* (tesis de postgrado). Universidad Nacional de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Baldwin, E., Nisperos, M., Chen, X., y Hagenmaier, R. (1996). Improving storage-life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, *9*, 151-163.

Baldwin, E., Nisperos, M., y Baker, R. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *35*(6), 509-524.

Barberán, T., y Espín, J. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.

Barea, M. (2015). *Caracterización, capacidad antioxidante y perfil fenólico de frutas subtropicales producidas y comercializadas en la costa de Granada-Málaga* (tesis postgrado). Universidad de la Rioja, Granada, España.

Barra, A., Romero, A., y Beltramino, J. (2012). Obtención de quitosano. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-10. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/173-Quitosano.pdf

Barrenechea, L., Campos, Y., Delgado, J., Jorge, C., & Luján, C. (2018). *Elaboración y comercialización de pulpa de fruta congelada* (proyecto integrador). Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, Perú.

Bautista, S., Hernández, A., Velázquez, M., Bosquez, E., y Sánchez, D. (2005). Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, *7*(1), 1-6.

Bello, J. (2000). *Principio generales de los alimentos*. Madrid, España: Díaz de Santo.

Besada, C., Novillo, P., Gil, R., Navarro, P., y Salvador, A. (2017). Causas del pardeamiento en caqui. *Sanidad vegetal, 286*, 30-35.

Besana Portal Agrario. (2008). *Composición y usos de la chirimoya*. Recuperado de http://www.portalbesana.es/estaticas/informacion/paginas/composicionyusos.html

Bickerstaff, G. (1997). Immobilization of enzymes and cells. *Methods in biotechnology, 1,* 1 - 11.

Bioversity International. (2008). *Descriptores para chirimoyo (Annona cherimola* Mill.*)*. Recuperado de https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Chirimoyo_1295.pdf

Blanquicet, R., Flores de Hoyos, C., González, Y., Meza, E., y Rodríguez, J. (2015). Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros , 25* (1), 58 - 69.

Bonavia, D., Ochoa, C., Tovar, S., y Palomino, R. (2004). Archaeological evidence of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and guanábana (*Annona muricata* L.) in ancient Peru. *Economic Botany*, *58*(4), 509-522.

Braverman, J. (1980). *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos.* Barcelona, España: Editorial Omega.

Bravo, M., Muñoz, K., Calderón, J., y Osorio, E. (2011). Desarrollo de un método para la extracción de polifenoloxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos.*Revista de la facultad de química farmacéutica, 18*(2), 124-132.

Brito, B., Rodríguez, M., Samaniego, I., Jaramillo, M., y Vaillant, F. (2008). Characterising polysaccharides in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) puree and their enzymatic liquefaction. *European Food Research and Technology*, *226*(3), 355-361.

Brito, B., y Rodríguez, M. (2008). *Aplicación de tecnologías agroindustriales para el tratamiento de la chirimoya con fines de exportación*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador [INIAP] - Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios [PROMSA]. Recuperado de http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2608/1/iniapscpl248.pdf

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles, M., Desbrieres, J., y Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, *42*, 3569 - 3580.

Bullon, O.(2003). *Estudio bibliográfico de la quitosana en el tratamiento de aguas residuales industriales* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

Butta, J., y Abbot, J. (2000). Browning Inhibition of Fresh-cut 'Anjou', 'Bartlett', and 'Bosc' Pears. *Horticulture Science, 35* (6), 1111 - 1113.

Cabañas, L. (2017). *Estudio de la influencia de la temperatura y tipo de pretratamiento en el color de las rodajas de manzana Var. Granny Smith, durante el proceso de pardeamiento enzimático* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Amazonas, Chachapoyas, Perú.

Cabezas, A. (2013). *Estrategias dirigidas a retrasar el pardeamiento enzimático en productos destinados a la IV Gama: alcachofas y patatas* (tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

Cabrel, S. (2018). *Influencia del pH en la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a partir de un hidrogel a base de β-Quitosano*. Universidad Peruano Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Calderón, J. (2015). *Evaluación de métodos de inactivación enzimática en la obtención de pulpa de membrillo (Cydonia oblonga)* (tesis de pregrado). Universidad Nacional del Centro del Perú, Junín, Perú.

Calvo, M. (2007). *Pardeamiento enzimático: Tirosina*. [PDF]. Recuperado de http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html

Campos, R., Defilippi, B., Romero, P., Valdés, H., Robledo, P., y Prieto, H. (2008). Effect of harvest time and L-cysteine as an antioxidant on flesh browning of fresh-cut cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Chilean Journal of Agricultural Research, 3*(68), 217-227.

Casado, J. (2004). *Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate (Lycopersicon esculentum* M.*). Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes* (tesis de posgrado). Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, España).

Castañeda, C., De la fuente, N., Pacheco, R., Rodríguez, T., y Barboza, J. (2011). Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta universitaria, 21* (3), 14-23.

Castro, N., y Vidal, C. (2015). Obtención y caracterización de quitina y quitosano del emerita analoga a escala piloto. *TZHOECOEN*, *7*(2), 182-197.

Castro, O. (2017). *Investigación aplicada con quitina y quitosano.* Lima, Perú: Editorial Académica Española.

Cerdas, M., Umana, G., y Castro, J. (2007). *Manual de manejo poscosecha de anona (Annona cherimola Mill).* Ministerio de Agricultura y Ganadería. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Chahuayo, E. (2014). *Utilización inhibidores del pardeamiento enzimático en pastas de palta (Persea americana* Mill.*) variedad fuerte mínimamente procesada* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.

Chang, R., y Goldsby, K. (2007). *Química*. México: Mc Graw-Hill.

Chávez, H., Acevedo, S., Luzardo, E., Valbuena, A., y Colina, M. (2018). Obtención y caracterización de quitosano entrecruzado con ácido cítrico. *Revista iberoamericana de polímeros y materiales, 19* (5), 227 - 235.

Chen, A., Taguchi, T., Sakai, K., Kikuchi, K., Wang, M., y Miwa, I. (2003). Antioxidant Activities of Chitobiose and Chitotriose. *Biological and pharmaceutical bulletin, 26* (9), 1326-1330.

Clydesdale, F. (1993). Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33(*1*),* 83–101.

Cob, N., Tello, J., Escamilla, J., Vargas, L., y Tamayo, J. (2010). Actividad de la polifenoloxidasa en el gel de sábila (*Aloe vera* Mill). *Revista iberoamericana de tecnología poscosecha*, *11* (2), 221-227.

Codex Alimentarius. (1995). *Norma general para los aditivos alimentarios: CODEX STAN 192-1995*. Recuperado de http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192s.pdf

Córdoba, R., y Hernández A. (1998). Utilidad de las utilizaciones farmacológicas a dosis fijas. *Atención primaria, 21* (4), 240 -244.

Cornejo, P. (7 de julio de 2017). Los ácidos carboxílicos. *Con-Ciencia Boletín Científico de la Escuela Preparatoria N° 3* [Boletín científico]. Recuperado de https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa3/article/download/2564/2590?inline=1

Cortés, M., y Chiralt, A. (2008). Cinética de los cambios de color en manzana deshidratada por aire fortificada con vitamin E. *VITAE, 15* (1), 8 - 16.

Coseteng, M., y Lee, C. (1987). Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. *Journal of food science, 52* (4), 985 - 989.

Crini, G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science, 30,* 38–70.

Damodaran, S., Parkin, K., y Fennema, O. (2010). Fennema: *Química de los alimentos.* Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.

De la Cruz, F. (2015). *Temperaturas de almacenamiento en la vida poscosecha de chirimoya (Annona cherimola) ecotipo Cumbe* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú).

De la Paz, N., Fernández, M., Darío, O., Nogueira, A., García, M., Pérez, D., Tobella, J., Montes de Oca, J., y Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista iberoamericana de polímeros, 13* (3), 103 - 116.

Del Pilar, I., Fischer, G., y Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, *25*(1), 83-95.

Diario Gestión. (12 de junio de 2015). *Productos de la Amazonía carecen de oportunidades e industrialización*. Recuperado de https://gestion.pe/economia/productos-amazonia-carecen-oportunidades-e-industrializacion-92383

Dima, J., Sequeiros, C. & Zaritzky, N. (2013). Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. En O. Pagola (Presidencia), *Energía - Sustentabilidad - Nanotecnologías - Bioprocesos - I&D, Desafíos del futuro*. Conferencia llevada a cabo en CAIQ2013 - VII Congreso Argentino de Ingeniería Química, Rosario, Argentina.

Dondero, M., Badilla, A., Tarky, W., y Garrido, F. (1985). Antecedentes sobre pardeamiento enzimático en alimentos. *Revista Alimentos. 10*(2): 32-39.

Doyle, M., Beuchat, L., y Montville, T. (2001). *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras*. Zaragoza, España: Acribia.

El Ghaouth, A., Arul, E., Ponnampalam, R., y Boulet, M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of food science, 56* (6), 1618 - 1620.

Erat, M., Sakiroglu, H., y Kufrevioglu, I. (2005). Purification and characterization of polyphenol oxidase from Ferula sp. *Food Chemistry, 95* (3), 503-508.

Escobar, D., Castro, A., y Vergara, N. (2013). Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Revistas de ciencias, 18* (1), 73 - 88.

Espinoza, E. (2007). *Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano, para su aplicación como biomaterial* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Etienne, A., Genard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié D., y Bugaud C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, *64*(6), 1451–1469.

Farfán, L. (2018). *Efecto del pelado semiautomatizado sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de pulpa de chirimoya (Annona cherimola* M.*)* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Flores, D. (2013). Cultivo de chirimoyo. Manual práctico para productores (1 ed.). *SN Power Proyecto Cheves.* Recuperado de https://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/MANUAL_CHIRIMOYA.pdf

Flores, J., Navarro, A., Ramos, K., Chang, L., Ale, N., Ly, M., y Maldonado, H. (2005). Adsorción de cu(II) por quitosano en polvo y perlas de gel. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *71* (1), 17 - 25.

Fonseca, M., Rodríguez, J., Herrera, A., y Fischer, G. (2012). Caracterización fisicoquímica del fruto de cuque (*Solanum vestissimum* Dunal) durante la maduración. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *6*(1), 31-40.

Food and Agriculture Organization [FAO]. (1987). *Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas: Las frutas y hortalizas frescas como productos perecibles*. Recuperado de http://www.fao.org/3/x5055s/x5055S02.htm#1.%20Las%20frutas%20y%20hortalizas%20frescas%20como%20productos%20perecibles

Food and Agriculture Organization [FAO]. (2006). *Fichas técnicas chirimoya (Annona cherimola)*. Recuperado de http://www.ipcinfo.org/fileadmin/user_upload/inpho/InfoSheet_pdfs/CHIRIMOYA.pdf

Friedman, M. (1997). Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *45*, 1523−1540.

Fuentes, L., y Pastor, A. (2009). Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante "*Dosidicus gigas*" para uso médico. *Revista de la sociedad química del Perú, 75* (1), 3 - 11.

Fuertes, H., & Gavilánez, A. (2012). *Proyecto de factibilidad para la creación de una microempresa procesadora y comercializadora de pulpa de chirimoya para el distrito metropolitano de Quito ubicado en la parroquia de Puellaro* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

Fundación Integra. (s.f.). *Chirimoya - Características*. Recuperado de https://www.regmurcia.com/servlet/s.Sl?sit=c,543,m,2715&r=ReP-23700-DETALLE_REPORTAJESPADRE

Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos [PROINPA]. (2009). *Manual de manejo integrado del cultivo de chirimoyo.* Recuperado de https://www.proinpa.org/tic/pdf/Frutales/Varios%20Frutales/pdf56.pdf

Gacén, J., y Gacén, I. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín intexter, 110,* 67-71.

Gallardo, J. (2003). *Purificación y Caracterización Cinética de la Enzima Polifenoloxidasa de Aguacate Hass ("Persea americana", Variedad "*Mill*") y del Compuesto Inhibitorio Presente en la Semilla del Mismo* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México.

García, B. (2017). *Innovación tecnológica para la polinización artificial de la chirimoya (Annona cherimola* Mill.*) en el municipio de Mizque* (tesis de postgrado). Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

García, C., Giraldo, G., Hurtado, H., y Mendivil, C. (2006). Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano *Gros michel* en diferentes estados de maduración. *Revista de la facultad de química farmacéutica, 13* (2), 13-19.

García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.* Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

García, J. (2013). *Estudio de liberación de sulfadiazina de plata desde matrices de quitosano para su uso como apósitos en quemaduras.* Universidad Pontificia Católica del Perú, Lima, Perú.

García, K., Gallegos, R., Madrigal, E., & Zepeda, L. (2008). Evaluación citotoxica in vitro de acetogeninas aisladas de *Annona cherimola* Mill. En K. García (Presidencia), *Salus cum propositum vitae*. Conferencia llevada a cabo en el 2° Congreso Nacional de Química Médica, Querétaro, México.

García, M. (2015).Potencialidades de la quitosana como agente antioxidante y antimicrobiano en la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología de Alimentos, 25*(1), 69.76.

Gasull, E., y Becerra, D. (2006). Caracterización de Polifenoloxidasa Extraída de Pera (cv. *Packam´s Triumph*) y Manzana (cv. *Red Delicious*). *Información Tecnológica, 17* (6), 69-74.

Geilfus, F. (1994). *El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies (Vol. 2)*. Turrialba, Costa Rica: ENDA-CARIBE/CATIE.

Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., y Fleotouris, D. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science, 75,* 256–264.

Gil, M., Conesa, M., y Artés, F. (2002). Quality changes in fresh cut tomato as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, *25*(2), 199-207.

Gil, M., Rojano, B., y Guerrero, C. (2012). Inhibición de la polifenoloxidasa extraída del banano (*cavendish*) por medio de algunos derivados del isoespintanol. *Corporación Universitaria Lasallista*, 193-247. Recuperado de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/148/1/11.%20193-248.pdf

Giraldo, J. (2013). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *University of Concepción*, 1-22. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/277302110_PROPIEDADES_OBTENCION_CARACTERIZACION_Y_APLICACIONES_DEL_QUITOSANO

Gonzáles, F., y Cornejo, A. (2014). Identificación in situ de ecotipos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) con aptitudes potencialmente comerciales en el distrito de Churubamba - Huánuco. *Investigación Valdizana*, *8*(1), 9-17.

González, J. (2015). *Manejo poscosecha de Annona cherimola en el valle de Puchka-Ancash para la producción de pulpa* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

González, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, *34*(3), 52-63.

Gouda, D. (2008). *Chitosan as an antimicrobial compound: Modes of action and resistance mechanisms* (tesis de doctorado). Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität, Bonn, Alemania.

Guerrero, C. (2009). *Inhibición de la actividad enzimática de la polifenoloxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Guevara, A. (1990). *Obtención de chirimoya (Annona cherimola) en polvo por atomización*. (tesis de postgrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Guibal, E. (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, *38*, 43–74.

Guilbert, S., Gontard, N. y Gorris, L. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, *29*, 10-17.

Gutiérrez, M., Del Mar, S., Pascual, L., y Vargas, A. (1994). Postharvest changes of sugar concentrations in chilled-injured Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Journal of Plant Physiology 143*(1), 27-32.

Heras, A. (2017). Quitosanos: biopolímeros creadores de sinergias. Funcionalidad y valor añadido. *Universidad Complutense de Madrid*. Recuperado de https://www.ucm.es/data/cont/docs/1334-2017-03-13-aheras1_QUITOSANOS_IM.pdf

Hernández, E., y Briceño, L. (2009). Evaluación del pardeamiento enzimático durante el almacenamiento en congelación del puré de palta (*Persea americana* Mill) Var. Hass. *Anales científicos, 70* (4), 24 - 35.

Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E., y Ramos E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueleto de camarón. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, 22* (3), 57 - 60.

Hernández, Y. (2004) *La quitina y la quitosana, polisacáridos animales de gran importancia.* Universidad de La Habana, Ciudad Habana , Cuba.

Hough, G., y Fiszman, F. (2005). *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos.* Madrid, España: Editorial Press.

Hussain, I., Zeb, A., y Ayub, M. (2011). Evaluation of apple and apricot blend juice preserved with sodium benzoate at refrigeration temperature. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, *6*(1), 79-85.

Ibáñez, F., Torre, P., e Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios - Área de Nutrición y Bromatología. *Universidad Pública de Navarra*, 1-10. Recuperado de http://muybio.com/wp-content/uploads/2012/10/aditivos-alimentarios.pdf

Ibarz, A., Casero, T., Miguelsanz, R., y Pagan, J. (1989). Efecto de la temperatura en la cinética de pardeamiento no enzimático en zumos clarificados de pera con diferentes contenidos de sólidos solubles. *Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 29*, 530-537.

InfoAgro. (2014). El cultivo del chirimoyo. [PDF]. Recuperado de http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/chirimoyo.htm

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático [INECC]. (s.f). Ácido cítrico. Recuperado de http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/Acido_citrico.pdf

Izquierdo, A., & Villanueva, C. (2018). E*valuación de la inactivación de la polifenoloxidasa por escaldado en inmersión y uso de antioxidantes en puré de palta (Persea americana "Hass") almacenado en refrigeración* (tesis de pregrado). Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa, Arequipa, Perú.

Janovitz, A., Richard, F., Goupy, P., y Nicolas, J. (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(7), 1437-1441.

Jiang, Y., Duan, X., y Zheng, H. (2016). Browning: Enzymatic Browning. *Encyclopedia of Food and Health*, 508-514.

Kader, A. (1986). Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology, 40*(4), 99-104.

Kader, A. (2008). Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(11), 1863-1868.

Kays, S. y Paull, R. (2004). *Postharvest biology*. Athens, Georgia: Exon Press.

Khan, T., Peh, K,. y Ch'ng, H. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 5* (3), 205-212.

Kim, K., y Thomas, R. (2007). Antioxidative activity of chitosan with varying molecular weights. *Food Chemistry, 101* (1), 308-13.

Kobashigawa, N. (2018). *Análisis de oportunidades comerciales en mercados exigentes de la chirimoya a partir del desarrollo de la cadena productiva en Huaura* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Koo, W. (12 de octubre de 2019). Chirimoya, Guanábana Fresca Perú Exportación 2019 Septiembre [Mensaje en un blog]. Recuperado de https://www.agrodataperu.com/2019/10/chirimoya-guanabana-fresca-peru-exportacion-2019-septiembre.html

Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology, 35*, 126-139.

Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers, 46* (1), 1–27.

Kumhar, D., Pareek, S., y Ameta, K. (2014). Effect of antioxidants and storage temperatures on browning and quality of custard apple (*Annona squamosa* L.) pulp. *Journal of Scientific and Industrial Research, (*73*),* 622-626.

Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros, 4* (2), 91-109.

Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química, 1*(2), 15-21.

Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en latinoamérica. *Revista UDO Agrícola, 8* (1), 1 - 22.

León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales (Vol.3)*. San José, Costa Rica: ENDA-CARIBE/CATIE.

Lobit, P., Genard, M., Soing, P., y Habib, R. (2006). Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of Experimental Botany*, *57*(6), 1471-1483.

López, A., y Di Sarli, A. (2016). El modelo CIElab, las fórmulas de diferencia de color y el uso de la norma europea en 12878 en morteros y hormigones coloreados. *Ciencia y tecnología de los materiales,* (6): 41 - 53.

López, C., García, M., Martínez, T., y Colinas, T. (2019). Compuestos nutricionales y antioxidantes en pulpa de chirimoya *(Annona cherimola* Mill.) *Agricultura protegida y horticultura*, 6-7.

López, S., & Granados, Y. (2012). *Bioproceso para la obtención de jugo de la chirimoya - vitamina C* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Pachuca, Hidalgo, Mexico.

Manayay, D., Ibarz, A., Castillo, W., y Palacios, L. (2013). Cinética de la diferencia de color y croma en el proceso térmico de pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. *Scientia Agropecuaria, 4*, 181 - 190.

Mariano, M. (2003). *Efecto de la radiación gamma en el proceso de maduración de la chirimoya (Annona cherimola)* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU,* (1), 53-58.

Mármol, Z. (2003). *Alternativas tecnológicas para el Aprovechamiento de las conchas de Camarón* (tesis de pregrado). Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Martínez, A., Díaz, G., y Ramírez, R. (2019). Estudio comparativo de obtención, caracterización y actividad antioxidante de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón estero y camarón de altamar. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *4*, 1002 - 1013.

Martinez, B., Serrano, M., Pretel, M., Riquelme, F. y Romojaro, F. (1993). Ethylene biosynthesis and physico-chemical changes during fruit ripening of cherimoya (Annona cherimola, Mill). *Journal of Horticultural Science, 68* (4), 477 - 483.

Martínez, M., Sanchez, L., Faus, M., y Gil, A. (1988). Cherimoya (*Annona cherimola* Mill,) Polyphenoloxidase:Monophenolase and Dihydroxyphenolase Activities. *Journal food science, 53*(4), 1191 - 1194.

Martínez, M., y Cantwell, M. (2002). Cambios de calidad en espinaca almacenada en atmósferas controladas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *8*(1), 49-62.

Mayer, A. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, *26*(1), 11–20.

Mcevelily, A., Iyengara, R., y Otwell, S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in food and beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, *32* (3), 253 - 273.

Mera, S. (2015). *Manejo poscosecha de frutas y hortalizas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

Merodio, C., y De la Plaza J. (1997). Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. *CAB International*, (4), 269-289.

Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG]. (2007). *Cultivo de la anona (Annona cherimola* Mill.*)*. Recuperado de http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9412.pdf

Morales, A., Cueva, B., y Aquino, P. (2004). Genetic diversity and geographic distribution of Annona cherimola in Southern Ecuador. *Lyonia*, *7*(2), 159-170.

Morales, A., Medina, A., Criollo, L., y Castro, P. (2006). Interpretive results in the inheritance of some characters of quality of the fruit of the Cherimoya (*Annona cherimola* Mill). *Lyonia*, *10*(1), 59-74.

Morales, A. (2015). *Aplicación de resveratrol y 6-bencilaminopurina para incrementar vida poscosecha en chirimoya* (tesis postgrado). Universidad Autónoma Del Estado de México, Toluca, México.

Morante, J., Agnieszka, A., Bru-Martínez, R., Carranza, M. Pico, R., y Nieto, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología, 7*(1), 23-31.

Moreiras, O., Carbajal, Á., Cabrera, L., y Cuadrado, C. (2003). *Tablas de composición de alimentos*. Madrid, España: Ediciones Pirámide.

Moreno, E., Alfaro, R., Guzmán, V., Rimaycuna, J., y Cruz, G. (2016). Efecto de la reducción del peso molecular de quitosano obtenido de plumas de pota (*Dosidicus gigas*) utilizando dos métodos de despolimerización sobre su capacidad antimicrobiana. *Revista de investigación científica Manglar, 13* (1), 25 - 33.

Mulawarman, J., Hallmann, D., Bell, B., Holtwiesche, K., y Sikora, R. (2001). Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, *66*, 609-617.

Muñoz, A., Sáenz, A., López, L., Cantú, L., y Barajas, L. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, 6* (12), 18-23.

Nakamatsu, J. (2012). La quitosana. *Revista de química PUCP*, 26, 1 - 2.

Nanos, G., y Kader, A. (1993). Low O2-induced changes in pH and energy charge in pear fruit tissue. *Postharvest Biology and Technology*, *3*(3), 285-291.

Navarro, A., Guzmán, D., y Gonzales, E. (2018). Influencia de las zonas de crecimiento en la composición físico química del fruto de *Solanum betaceum* Cav. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *84*(1), 68-76.

Nielsen, S. (2010). *Food analysis*. New York, USA: Editorial Springer.

Nielsen. (Ed.). (2003), Food *Analysis Laboratory Manual. Determination of Moisture Content* (pp. 19-21; 95-100). New York, USA: Editorial Springer.

Niquette, P., Monette, F., Azzouz, A., y Hausler, R. (2004). Impacts of Substituting Aluminum-Based Coagulants in Drinking Water Treatment. *Water Quality Research Journal, 39* (3), 3003-310.

Nisar, R., Baba, W., y Ahmad, F. (2015). Effect of chemical and thermal treatments on quality parameters and antioxidant activity of apple (pulp) grown in high Himalayan regions. *Cogent Food & Agriculture, 1* (1), 1-13.

NTS, N°071 - MINSA/DIGESA-V.01. (2003). Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Ministerio de Salud del Perú. Lima, Perú.

Osterloh, A., Ebert, G., Held, W., Schulz, H., y Urban, E. (1996). *Handbuch der Lebensmitteltechnologie - Lagerung von Obst und Südfrüchten.* Stuttgart, Germany: Editorial Ulmer.

Otwell, S., y Mcevelily, A. (1992). Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. *Journal Aquat. Food Product Technology*, *1*, 53 - 65.

Palma, T., Aguilera, J., y Stanley, D. (1993). A review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biology and Technology, 2*(3), 187-208.

Pamplona, J. (2006). *Salud por los alimentos*. Madrid, España: Editorial Safeliz.

Pangborn, R. (1963). Relative Taste Intensities of Selected Sugars and Organic Acids. *Journal of Food Science*, *28*(6), 726-733.

Pantastico, E. (1979). *Fisiología de la post recolección, manejo y utilización de frutas y hortalizas tropicales y subtropicales*. Ciudad de México, México: Editorial Continental.

Pantastico, E. (1981). *Fisiología de post-recolección*. Ciudad de México, México: Editorial Limusa.

Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances, 25*, 244-263.

Parada, L., Crespín, G., Miranda, R., y Katime, I. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros, 5*(1), 1 - 16.

Pardo, G., & Méndez, S. (2017). *Evaluación del efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático en el fruto de anona pulpa rosada (Annona diversifolia) y en la cinética de la polifenoloxidasa* (tesis de pregrado). Universidad De El Salvador, San Salvador, El Salvador.

Paredes, M., y Espinosa, D. (2009). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana, 28*(1), 61-70.

Pastor, A. (2004). *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima, Perú: PUCP.

Peniche, C., Argüelles, W., Gallardo, A., Elvira, C., y San Román, J.(2001). Quitosano: Un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. *Revista de plásticos modernos, 81* (535), 81 - 91.

Pentzke, M. (2006). *Efecto del oxígeno ionizado y el a triacilglicerol en la calidad poscosecha de frutos de chirimoyo (Annona cherimola* Mill.*) Cv. Concha lisa, provenientes de altas y bajas densidades de plantación, en almacenaje refrigerado* (tesis postgrado). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.

Pérez, L. (2003). *Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad blanquilla) mínimamente procesada* (tesis de post grado). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Pérez, R. (2013). Exactitud de las tablas de composición de alimentos en la determinación de nutrientes. *Sanidad Militar*, *69*(2), 102-111.

Pérez, Y. (2010). *Eventos fisiológicos asociados a la madurez y calidad de los frutos cítricos en Cuba y su relación con los productos transformados de la industria*. Food and Agriculture Organization [FAO]. Recuperado de http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1067/cuf0114s.pdf

Perkins, P., y Collins, J. (2001). Contributions of nonvolatile phytochemicals to nutrition and flavor. *HortTechnology*, *11*(4), 539-546.

Pino, J. (2018). Conocimiento actuales sobre los compuestos del aroma de la chirimoya. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 28* (1), 56-62.

Porto, A. (2019). Biomoléculas: Glúsidos. [PDF]. Recuperado de http://www.bionova.org.es/biocast/tema07.htm

Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, *27*(1), 76-89.

Quintero, V., Giraldo, G., Lucas, J., y Vasco, J. (2013). Caracterización fisicoquímica del mango común (Mangifera indica L.) durante su proceso de maduración. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, *11*(1), 8-18.

Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., y Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules, 4 (*6), 1457-1465.

Ramírez, C., Delgado, E. y Andrade, J. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y raman. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria, 4* (1), 769-776.

Ramos, E. (18 de enero de 2019). Importante incremento en la exportación de chirimoya y guanábana. *Agencia Agraria de Noticias* [Boletín diario de noticias]. Recuperado de https://agraria.pe/noticias/importante-incremento-en-la-exportacion-de-chirimoya-y-guana-18238

Reddy, N., y Yang, Y. (2009). Citric acid cross-linking of starch films. *Food chemistry,118* (3), 702 - 711.

Rembado, M., y Sceni, P. (2009). *La química en los alimentos.* Buenos Aires, Argentina: Las ciencias naturales y matemáticas.

Reyes, M., Gómez, I., Espinoza, C., Bravo, F., y Ganoza, L. (2009). *Tablas peruanas de composición de alimentos.* Instituto Nacional de Salud. Recuperado de http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla%20de%20Alimentos.pdf

Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., y González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, *16* (2), 66 - 77.

Rivada, F. (2008). *Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha* (tesis de pregrado). Universidad de Cádiz, Andalucía, España.

Rivas, C. (2010). *Microencapsulación y estabilización enzimática del jugo de chirimoya (Annona cherimola* Mill.*)* (tesis de postgrado). Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Robledo, P. (2007). *Estudio de la acción de aditivos en chirimoya mínimamente procesada* (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Rodríguez, A., Ramírez, M., Rivero, D., Bosquez, E., Barrera, L., y Bautista, S. (2009). Propiedades química - estructural y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura, 15*(3), 307-317.

Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, H., y López, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista Sociedad Química del Perú, 76* (4), 336 - 354.

Salazar, J., Lizardi, J., Ramírez, J., García, G., Ezquerra, J., Valenzuela E., Carvallo, M., Lugo, M., y Pacheco, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efecto en su estabilización y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química, 13* (1), 129-150.

Sánchez, A. (2016). *Quitooligosacáridos bifuncionales: relación entre características químico-físicas y propiedades biológicas* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Sapers, G.(1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technology*, 47, 75-84.

Sato, H., Mizutani, S., y Tsuge, S. (1998). Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-Gas chromatography in the presence of oxalic acid. *Analytical Chemistry, 70* (1), 7-12.

Schiavinato, D., y Harris, M. (2018). Huerta fácil en casa: Conservar nuestros productos. [PDF]. Recuperado de https://books.google.com.pe/books?id=THRJDwAAQBAJ&pg=PP1&lpg=PA19&focus=viewport&dq=Huerta+F%C3%83A1cil+en+casa+24#v=onepage&q&f=false

Sepúlveda, A. (2010). Efecto de inhibidores del pardeamiento enzimático en peras (*Pyrus communis* L.) cv. Packham's Triumph mínimamente procesadas (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Sevillano, L (2007). *Expresión de Proteínas de estrés de bajo peso molecular en mesocarpio de chirimoya (Annona cherimola* Mill.*)* (tesis de postgrado). Universidad de Granada, Andalucía, España.

Shahidi, F., Arachchi, J., y Jeon, Y. (1999). Food application of chitin and chitosans. *Trends in food science and technology, 10* (2), 37 - 51.

Shankar, D. (2009). *Effect of Antioxidants and Storage Temperatures on Browning and Quality of Custard Apple* (*Annona squamosa* L.) *Pulp* (tesis de maestría). Universidad de Agricultura y Tecnología, Udaipur, India.

Silveira, A. (2017). Uso de aditivos y métodos físicos para mantener la calidad de los productos de IV gama o mínimamente procesados. *Agrociencia Uruguay*, *21*(1), 1-6.

Singla, A., y Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal Pharmacy and Pharmacology, 53*, 1047-1067.

Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior [SIICEX]. (2017). *Perfil Producto Mercado: Chirimoya en Estados Unidos*. Recuperado de http://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/estudio/812508479rad43EA7.pdf

Skoog, D., Holler, F., y Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México D.F., México: Cengage Learning.

Son, S., Moon, K,. y Lee, C. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry, 73* (1), 23-30.

Suárez, R. (5 de agosto de 2009). Frutas y verduras: pardeamiento enzimático [Mensaje en un blog]. Recuperado de http://controldecalidadenfrutasyverduras.blogspot.com/pardeamiento-enzimatico.html

Sucapuca, M. (2013). *Evaluación de la vida en anaquel de la chirimoya (Annona cherimola* Mill.*) mínimamente procesada con el uso de antioxidantes envasados al vacío y almacenada a temperatura baja* (tesis de pregrado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.

Sugimoto, M., Morimoto, M., Sashiwa, H., Saimoto, H., y Shigemasa, Y. (1998). Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers, 36*, 49-59.

Sylva, I. (2009). La chirimoya y las nuevas tendencias de mercado. *Revista de Agronegocios El Huerto, 15*, 29-31.

Tacán, M. (2007). *Caracterización agromorfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (Annona muricata) y chirimoya (Annona cherimola) en fincas de agricultores y condiciones ex situ en Costa Rica* (tesis de postgrado). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

Tejerina, L. (2017). *Caracterización de los principales genes y metabolitos responsables del aumento de la acidez durante la maduración de la chirimoya (Annona cherimola* Mill.) (tesis de posgrado). Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

Tomida, H., Yasufuku. T., Fujii, T., Kondo, Y., Kai, T., y Anraku, M. (2010). Polysaccharides as potential antioxidative compounds for extended release matrix tablets. *Research Carbohydrate, 345* (1), 82-86.

Torres, A. (27 de mayo de 2013). Asociaciones impulsarán gremio de chirimoya. *Agencia Agraria de Noticias* [Boletín diario de noticias]. Recuperado de https://agraria.pe/noticias/productores-de-huarochiri-exportan-1600-kilos-11796

Ulrich, R. (1970). Constituents of fruits - Organic acids. *The biochemistry of fruits and their products*, *1*, 89-117.

Undurraga, P., Olaeta, J., y Mac, H. (1998). Identificación y caracterización de desórdenes fisiológicos en chirimoyas (Annona cherimola Mill.) cv. concha lisa en refrigeración. *Revista Chapingo Serie Horticultura, 4(*1), 5-12.

Valencia, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria, 2* , 32-38.

Valenzuela, C. (2006). *Obtención de quitosano de pota (Dosidicus gigas) empleando altas dosis de radiación gamma* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Valero, E. (1993). *Caracterización cinética de la polifenol oxidasa de uva airen* (tesis de posgrado). Universidad de Castilla- La Mancha, Ciudad Real, España.

Van Damme, P., Van Damme, V., & Scheldeman, X. (Agosto de 1999). Commercial development of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) in Latin America. En P. Van Damme (Presidencia), *Proceedings of the First International Symposium on Cherimoya*. Simposio llevado a cabo en el First International Symposium on Cherimoya, Loja, Ecuador.

Van Damme, P., y Scheldeman, X. (1999). *El fomento del cultivo de la chirimoya en América Latina*. Food and Agriculture Organization [FAO]. Recuperado de http://www.fao.org/3/x2450s09.htm

Vasco, C., Ruales, J., y Kamal, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry, 111*,816–823.

Vergaray, R. (2018). *Utilización del plasma y fracción celular de la sangre de cuy (Cavia porcellus) en la formulación de galletas fortificadas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú.

Vila, L. (2006). *Caracterización físico-química del membrillo japonés* (*Chaenomeles* sp. Lindl,). *Desarrollo fisiológico y conservación frigorífica* (tesis de postgrado) Universidad de Murcia, Murcia, España.

Vinsova, J., y Vavrikova, E. (2011). Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities a Review. *Current Pharmaceutical Design, 17*(32), 3596 - 3607.

Vit, P., Santiago, B., y Pérez, E. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, *39* (5), 350-353.

Wade, L. G. (2012). *Química orgánica*. Naucalpan de Juárez, México: Pearson.

Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., y Joyce, D. (1998). *Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals*. Wallingford, Inglaterra: Editorial CAB International.

Wisal, S., Ullah, J., Zeb, A., y Khan, M. (2013). Effect of refrigeration temperature, sugar concentrations and different chemicals preservatives on the storage stability of strawberry juice. *International Journal of Engineering and Technology*, *13*(2), 160-168.

Wu, A. (1988). Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*, *161*, 447-452.

Yali, S., & Loarte, M. (2015). *Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta de procesamiento de pulpas de frutas para el mercado estadounidense* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

Yurivilca, C. (2002). *Obtención de fruta confitada a partir del chayote (Sechium edule L.) por el método del proceso lento* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria De La Selva, Tingo María, Perú.

Zhang, D., y Quantick, C. (1997). Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Biology Technology, 1*2, 195-202.

8. ANEXOS

Anexo 1. Obtención del quitosano a partir de la pluma de pota.

Figura 39. Proceso para obtener quitosano a partir de la pluma de pota.

A) Recolección de la pluma de pota en el Terminal Pesquero del distrito de Ventanilla.
B) Recepción de la pluma de pota en el "Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica".
C) Lavado y molido de la pluma de pota en la licuadora industrial.
D) Primer pesado del NaOH para obtener una solución al 10%.
E) Desproteinización de la pluma de pota.
F) Primer lavado hasta obtener un *p*H cercano a 7.
G) Segundo pesado del NaOH para obtener una solución al 10%.
H) Desacetilación de la quitina.
I) Segundo lavado hasta obtener un *p*H cercano a 7.
J) Secado del quitosano en estufa a 40° C.
K) Almacenamiento del quitosano en un recipiente de vidrio.

Anexo 2. Preparación de las soluciones de quitosano.

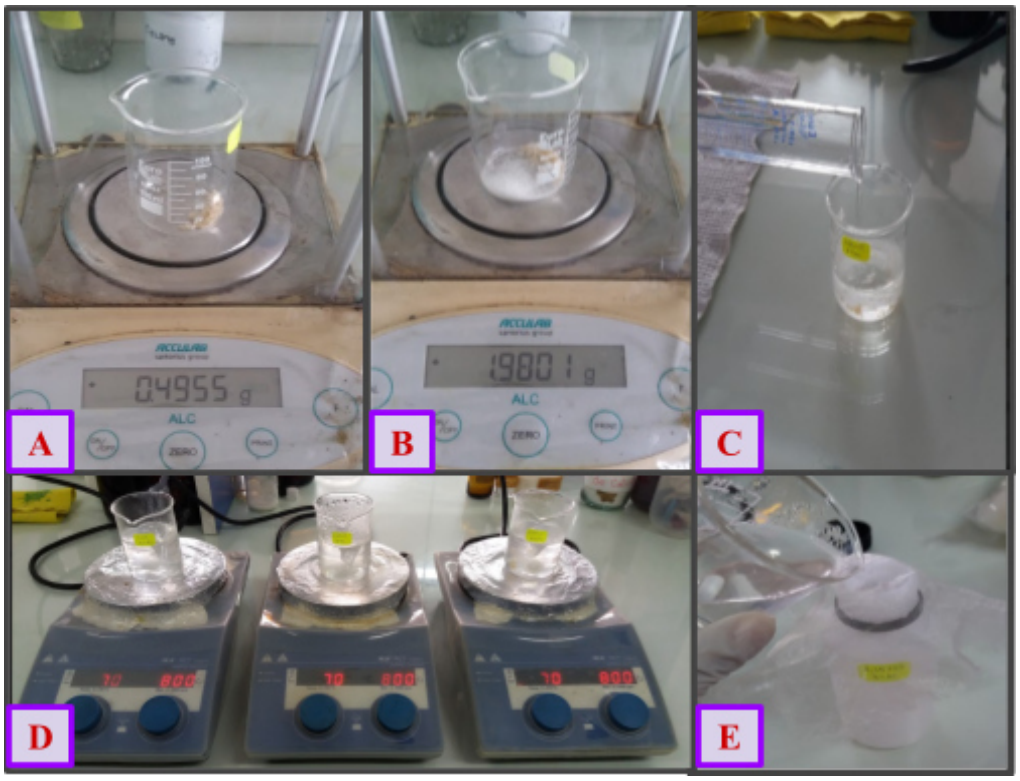


Figura 40. Preparación de las soluciones de quitosano, ácido cítrico y quitosano con ácido cítrico.

A) Peso exacto de quitosano en la preparación de una solución al 0,75%.
B) Peso exacto de ácido cítrico en la preparación de una solución al 3%.
C) Adición de agua destilada necesaria.
D) Agitado a 70° C a 800 rpm durante 4 h de las 3 soluciones preparadas.
E) Filtrado de la solución.

Anexo 3. Obtención, envasado y almacenamiento de la pulpa de chirimoya.

Figura 41. Proceso para obtener la pulpa de chirimoya.

A) Cosecha de la chirimoya Lisa proveniente del anexo La Merced de Chaute.
B) Recepción de la chirimoya en el laboratorio de síntesis.
C) Selección de la chirimoya según peso, calibre y daños físicos.
D) Lavado y desinfectado.
E) Pelado.
F) Despepitado.
G) Pulpeado de la chirimoya.
H) Pulpa de chirimoya.
I) Pesado de la pulpa para cada tratamiento.
J) Adición de las soluciones de quitosano para cada tratamiento.
K) Mezclado homogéneo de cada tratamiento.
L) Adición de cada pulpa tratada en bolsas de polietileno.
M) Envasado de cada tratamiento.
N) Tratamientos obtenidos al final del estandarizado.

Anexo 4. Determinación del porcentaje de humedad del quitosano.

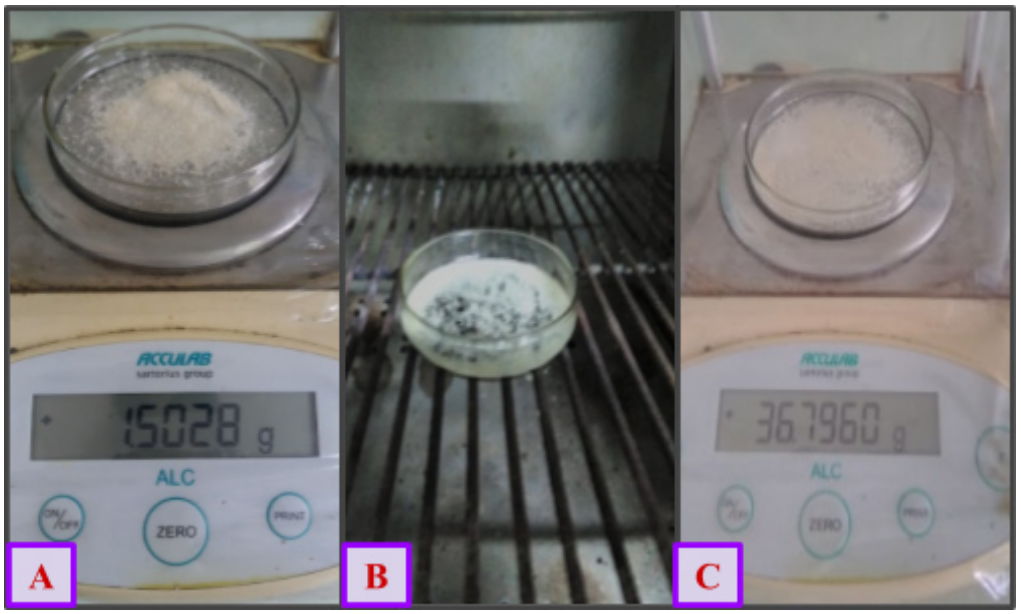


Figura 42. Determinación del porcentaje de humedad del quitosano.

A) Peso inicial exacto de la muestra de quitosano.
B) Muestra de quitosano llevado a estufa (70° C durante 48 h).
C) Peso final exacto de la muestra de quitosano.

- **Cálculo del porcentaje de humedad:**

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso muestra de quitosano}} \times 100\%$$

Donde:

Peso inicial: Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano (g)
Peso final: Peso de la placa petri (g) + Peso de la muestra de quitosano seco (g)

Datos:

Peso de la placa petri: 35,4514 g
Peso de la muestra inicial: 1,5028 g
Peso final: 36,7960 g

Cálculo:

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{(35{,}4514\text{g} + 1{,}5028\text{g}) - 36{,}7960\text{g}}{1{,}5028\text{g}} \times 100\%$$

$$\%\ \text{Humedad} = 10{,}52\%$$

Anexo 5. Determinación del porcentaje de cenizas del quitosano.

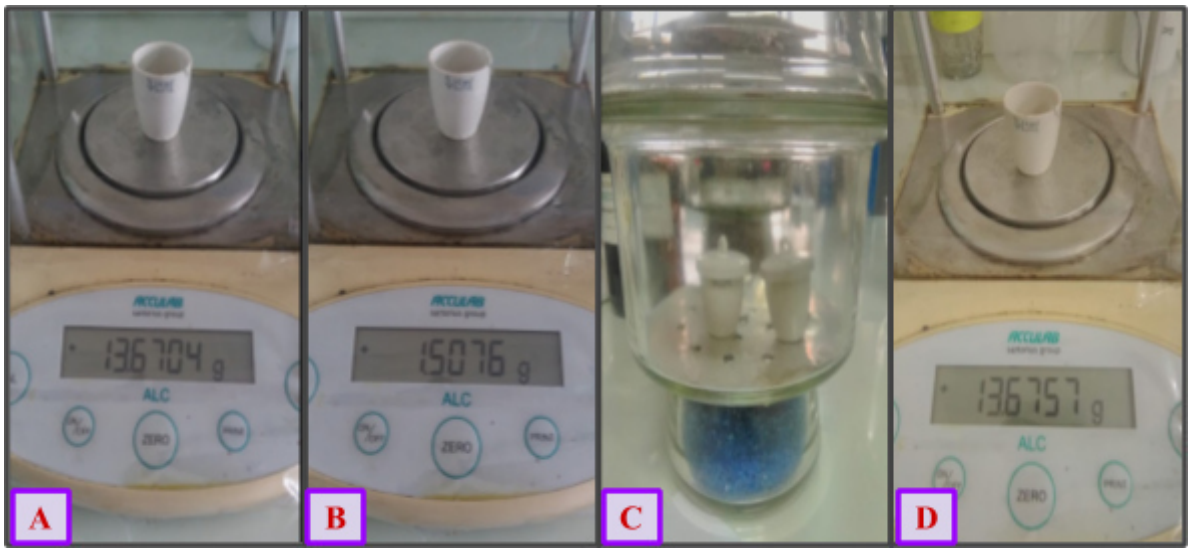


Figura 43. Determinación del porcentaje de cenizas del quitosano.

A) Peso exacto del crisol.
B) Peso exacto de la muestra seca de quitosano.
C) Enfriamiento a temperatura ambiente dentro de un desecador (15 min).
D) Peso exacto de la muestra de cenizas del quitosano más el peso del crisol.

- **Cálculo del porcentaje de cenizas:**

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100\%$$

Datos:

Peso del crisol: 13,6704 g
Peso de la muestra seca: 1,5076 g
Peso del crisol + cenizas: 13,6757 g

Cálculo:

$$\%\ \text{Cenizas} = \frac{13{,}6757\ \text{g} - 13{,}6704\ \text{g}}{1{,}5076\ \text{g}} \times 100\%$$

$$\%\ \text{Cenizas} = 0{,}35\%$$

Anexo 6. Determinación de la viscosidad del quitosano.

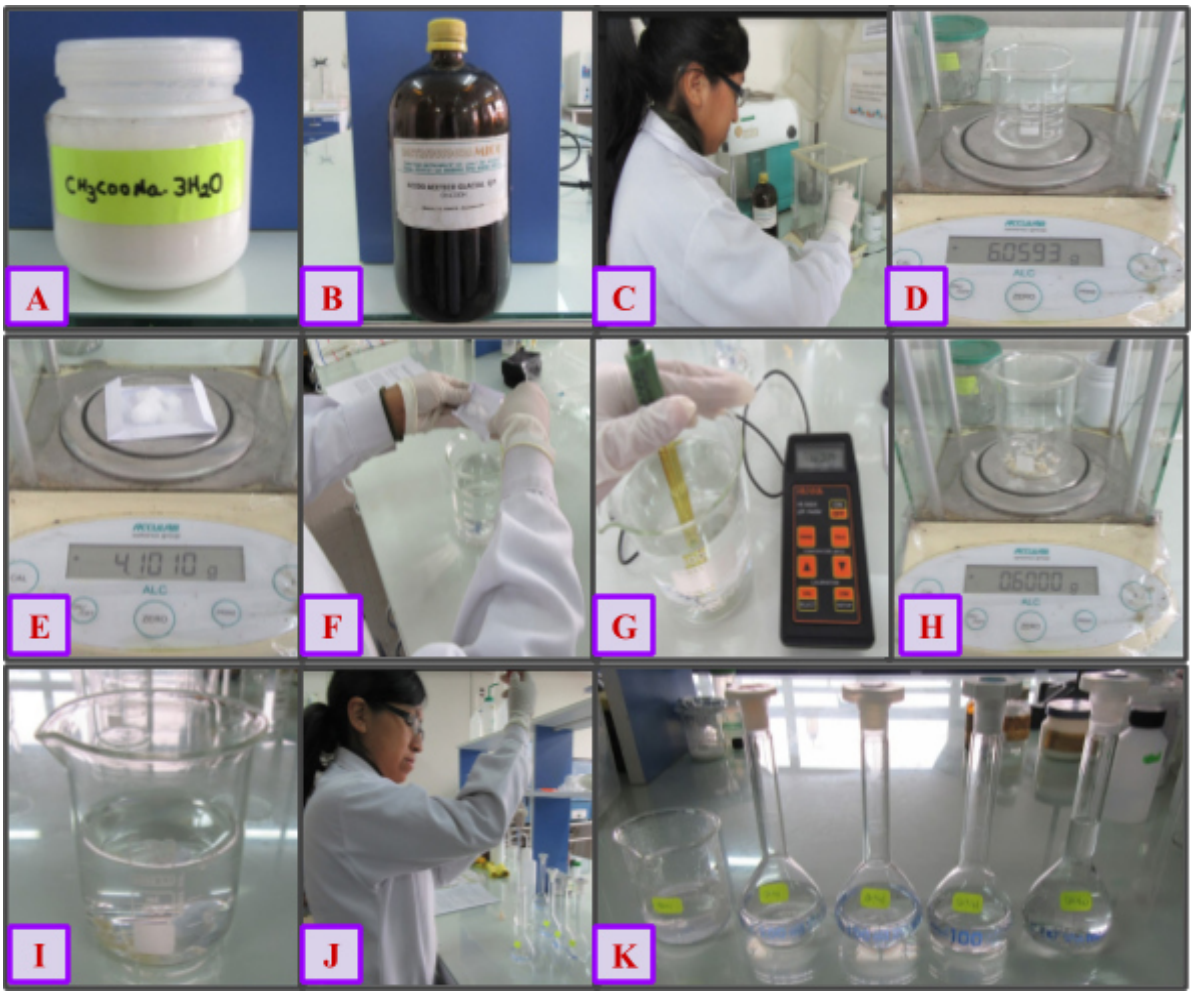


Figura 44. Preparación de la solución buffer y las diluciones Q 1/2 , Q 1/4, Q 1/8, Q 1/16.

A) Acetato de sodio.
B) Ácido acético glacial químicamente puro (Qp).
C) Peso de los reactivos.
D) Peso exacto según el cálculo del ácido acético glacial Qp (500 ml solución a 0,2 M).
E) Peso exacto según el cálculo del acetato de sodio (500 ml solución a 0,1 M).
F) Adición del acetato de sodio a la solución de ácido acético a 0,2 M.
G) Medición de *p*H del buffer preparado (*p*H = 4,2).
H) Peso exacto del quitosano.
I) Disolución del quitosano en 100 ml de la solución buffer preparada.
J) Disoluciones a partir de la solución Q1 de quitosano (solución patrón).
K) Disoluciones de quitosano (Q1, Q1/2, Q1/4, Q1/8, Q1/16) a partir de la solución Q1.

- **Cálculo de la preparación de las soluciones buffer:**

- ***Solución de ácido acético de 0,2 M (500ml).***

Se utilizó una solución de ácido acético glacial (QP) cuya concentración de 99,2%.

$$M = \frac{\eta_{sto}}{V}$$

$$0{,}2\ M = \frac{\eta_{sto}}{0{,}5\ L}$$

$$0{,}1\ moles = \eta_{sto}$$

$$0{,}1\ moles = \frac{m_{sto}}{P.F.}$$

$$0{,}1\ moles = \frac{m_{sto}}{60{,}052\ g/mol}$$

$$6{,}0052\ g = m_{sto}$$

Luego del cálculo de la cantidad de ácido acético necesario, se reemplazó en la siguiente fórmula para obtener el peso de ácido acético (QP) para preparar la solución a 0,2 M.

$$\%\ w/_{w} = \frac{m_{sto}}{m_{sol}} \times 100\%$$

$$99{,}2\% = \frac{6{,}0052\ g}{m_{sol}} \times 100\%$$

$$6{,}0536\ g = m_{sol}$$

Finalmente, se pesó 6,0593 g de la solución de ácido acético (QP) y finalmente se enrrasó a 500 ml con agua destilada en una fiola.

- ***Solución buffer (0,2M en ácido acético y 0,1 M de acetato de sodio).***

$$0,1\ M = \frac{\eta_{CH_3COONa}}{0,5\ L}$$

$$0,05\ moles = \eta_{CH_3COONa}$$

$$0,05\ moles = \frac{m_{CH_3COONa}}{82,0343\ g/mol}$$

$$4,1017\ g = m_{CH_3COONa}$$

Finalmente se pesó 4,1010 g de CH_3COOH y se añadió a la solución de ácido acético preparado anteriormente, obteniendo los 500 ml de buffer de 0,2 M de CH_3COOH y 0,1 M CH_3COONa.

- **Preparación de las disoluciones Q1/2, Q1/4, Q1/8 y Q1/16 a partir de Q1.**

Se pesó exactamente 0,6 g de la muestra de quitosano purificado y con una probeta graduada se añadió 100 ml de la solución de buffer.

Las diluciones se realizaron en fiolas de 100 ml, para ello se tomó 50 ml de la solución Q(1) con una pipeta graduada y se añadió 50 ml de buffer obteniendo de esta manera la solución Q(1/2). Este mismo procedimiento se siguió para las siguientes diluciones (Q1/4, Q1/8, y Q1/16).

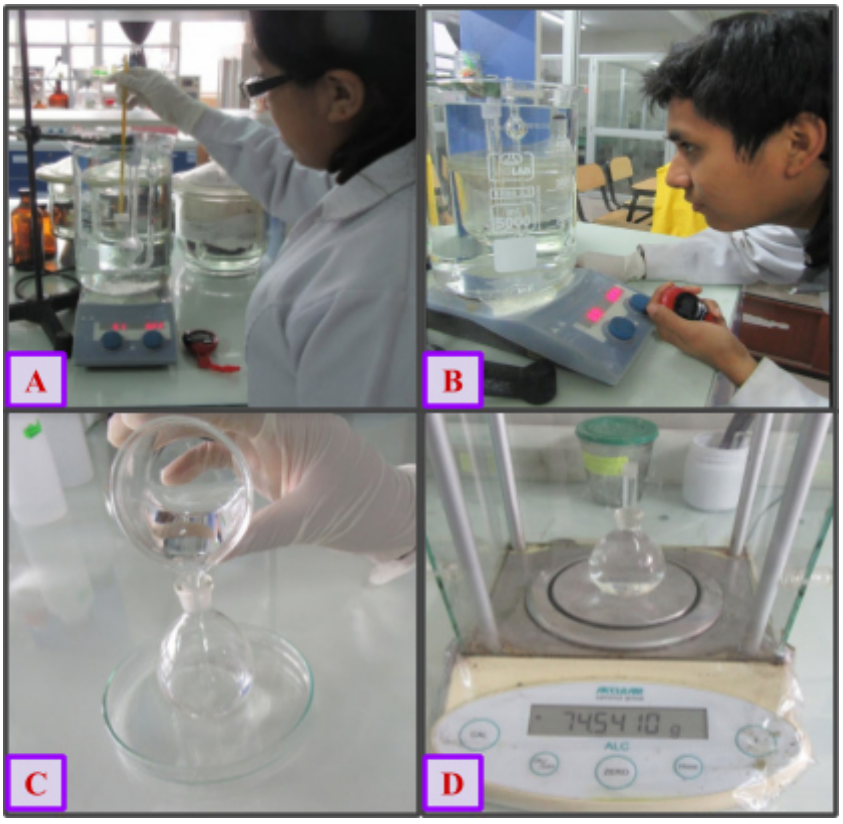


Figura 45. Medición de la viscosidad y determinación de la densidad del buffer.

A) Registro de temperatura del baño maría (30° C).
B) Medición del tiempo de flujo para cada una de las soluciones.
C) Adición del buffer preparado al picnómetro.
D) Peso exacto del buffer + el peso del picnómetro.

- **Descripción de los cálculos:**

- ***Cálculo de la constante del viscosímetro.***

A partir de la densidad y viscosidad teórica del agua a 30° C rescatados del libro Transferencia de calor y masa (4ta edición del Cengel - pág. 878) y con el tiempo promedio del flujo obtenido de forma experimental, se calculó la constante del viscosímetro mediante la siguiente fórmula:

$$\eta = B \times \rho \times t$$

Datos:

$$\rho_{agua@30\,°C} = 996\,\frac{kg}{m^3}$$

$$\eta_{agua@30\,°C} = 0{,}00798 \text{ poise (Pa.s.)}$$

$$t_{agua@30\,°C} = 16{,}45 \text{ s}$$

Reemplazando, se obtiene:

$$0{,}00798\frac{kg}{m.s} = B \times 996\frac{kg}{m^3} \times 16{,}45 \text{ s}$$

$$B = 4{,}8705 \times 10^{-7}\,\frac{m^2}{s^2}$$

- ***Cálculo de la densidad de las soluciones y del solvente (Buffer).***

Para cada disolución de quitosano y buffer preparado se determinó su densidad utilizando un picnómetro de 50 ml. Los cálculos se detallan en la siguiente Tabla 35.

Tabla 35
Densidad de las soluciones de quitosano y del solvente (Buffer)

Solución	Masa del picnómetro	Masa del pic + sol (g)	Masa de la solución (g)	Volumen (ml)	Densidad (g/ml)	Densidad (kg/m^3)
Buffer	22,4514	74,5410	52,0896	50	1,0418	1041,8
Q(1/2)	22,4514	74,3364	51,8850	50	1,0377	1037,7
Q(1/4)	22,4514	74,3014	51,8500	50	1,0370	1037,0
Q(1/8)	22,4514	74,2914	51,8400	50	1,0368	1036,8
Q(1/16)	22,4514	74,2764	51,8250	50	1036,5	1036,5

- ***Cálculo de la viscosidad de las soluciones de quitosano y del solvente (Buffer).***

Para 10 ml de cada disolución de quitosano se tomó el tiempo de flujo por cuadruplicado (Tabla 36), obteniendo el tiempo promedio de flujo el cual se utilizó en el cálculo de su viscosidad junto con la densidad y la constante del viscosímetro hallada anteriormente.

Tabla 36
Tiempo de flujo del agua, buffer y soluciones de quitosano.

Tiempo (s)	Agua (s)	Buffer (s)	Q 1/2 (s)	Q 1/4 (s)	Q 1/8 (s)	Q 1/16 (s)
T1	16,54	17,74	75,01	40,13	27,4	21,74
T2	16,4	17,72	75,03	40,05	27,39	21,75
T3	16,45	17,69	75,05	40,09	27,37	21,78
T4	16,41	17,73	75,05	40,02	27,39	21,7

El cálculo de la viscosidad para cada disolución de quitosano y solvente (buffer) preparado se detalla en la siguiente Tabla 37.

Tabla 37
Viscosidad de las soluciones de quitosano y del solvente (Buffer)

Muestra	Buffer	Q (1/2)	Q (1/4)	Q (1/8)	Q (1/16)
Tiempo promedio (s)	17,72	75,04	40,07	27,39	21,74
Densidad (kg/m^3)	1041,8	1037,7	1037,0	1036,8	1036,5
Viscosidad (poise)	0,008991	0,037926	0,020238	0,013831	0,010975

- ***Cálculo de la viscosidad intrínseca del quitosano.***

La viscosidad intrínseca del quitosano se obtuvo a partir de la intersección de las gráficas $\mathrm{Ln}\,\eta_r/C$ (viscosidad inherente) vs C y η_e/C (viscosidad reducida) vs C cuando la concentración del quitosano es cero ($C=0$). La Tabla 38 muestra los valores obtenidos de la viscosidad relativa (η_r), viscosidad específica (η_e) y la concentración del quitosano en g/ml.

Tabla 38
Cálculo de la viscosidad relativa y específica para la muestras diluidas de quitosano

Muestra	C (g/ml)	η (poise)	η_r	η_e	η_e/C (ml/g)	$\mathrm{Ln}\,\eta_r/C$ (ml/g)
Q (1/2)	0,003	0,037926	4,2180	3,2180	1072,68	479,79
Q (1/4)	0,0015	0,020238	2,2509	1,2509	833,91	540,88
Q (1/8)	0,00075	0,013831	1,5383	0,5383	717,72	574,23
Q (1/16)	0,000375	0,010975	1,2206	0,2206	588,32	531,63

De la Figura 38 se extrapola los valores de viscosidad intrínseca del quitosano a partir de las rectas de la viscosidad reducida (η_e/C vs C) y viscosidad inherente ($\mathrm{Ln}\,\eta_r/C$ vs C) cuando la concentración es cero, obteniendo viscosidades de 598 y 605 ml/g respectivamente. Finalmente se tomó el promedio de ambos resultados como la viscosidad intrínseca para el quitosano, resultando 602 ml/g.

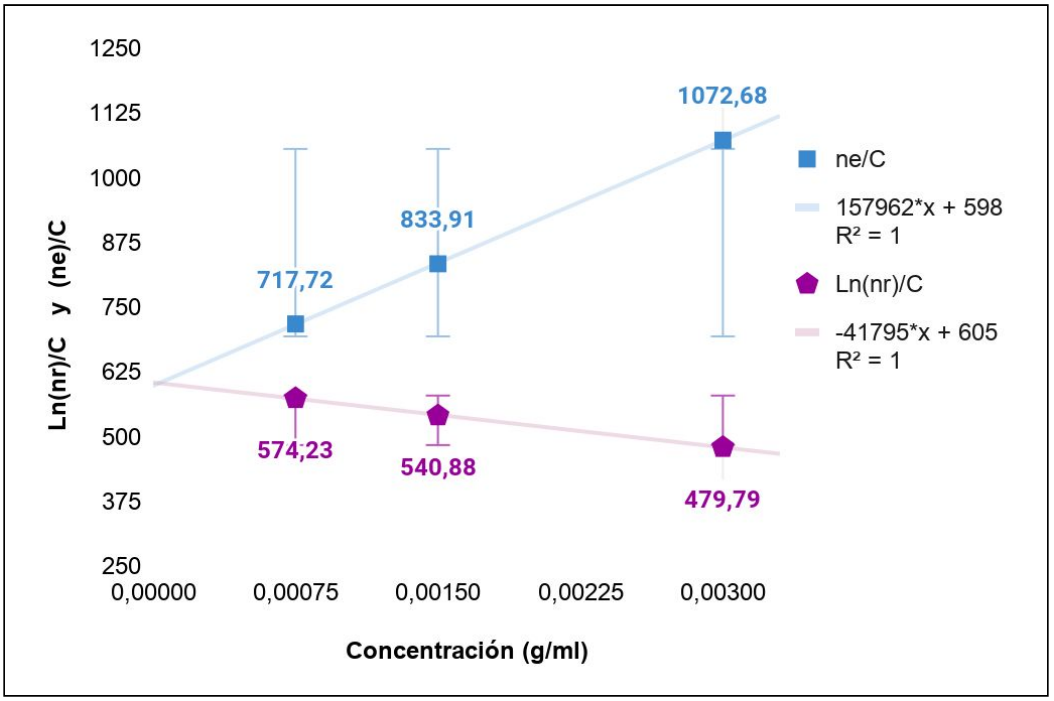


Figura 46. Viscosidad intrínseca del quitosano.

Anexo 7. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por espectroscopía IR.

Figura 47. Determinación del grado de desacetilación (GD) del quitosano por espectroscopía IR.

A) Muestra de quitosano y KBr de grado para análisis.
B) Mezclado de 2 mg de quitosano con 98 mg de KBr en un mortero.
C) Adición de la mezcla al pastillador.
D) Formación de la pastilla mediante prensa manual durante 30 min.
E) Retiro de la pastilla formada.
F) Lectura de la pastilla en el equipo infrarrojo (IR).

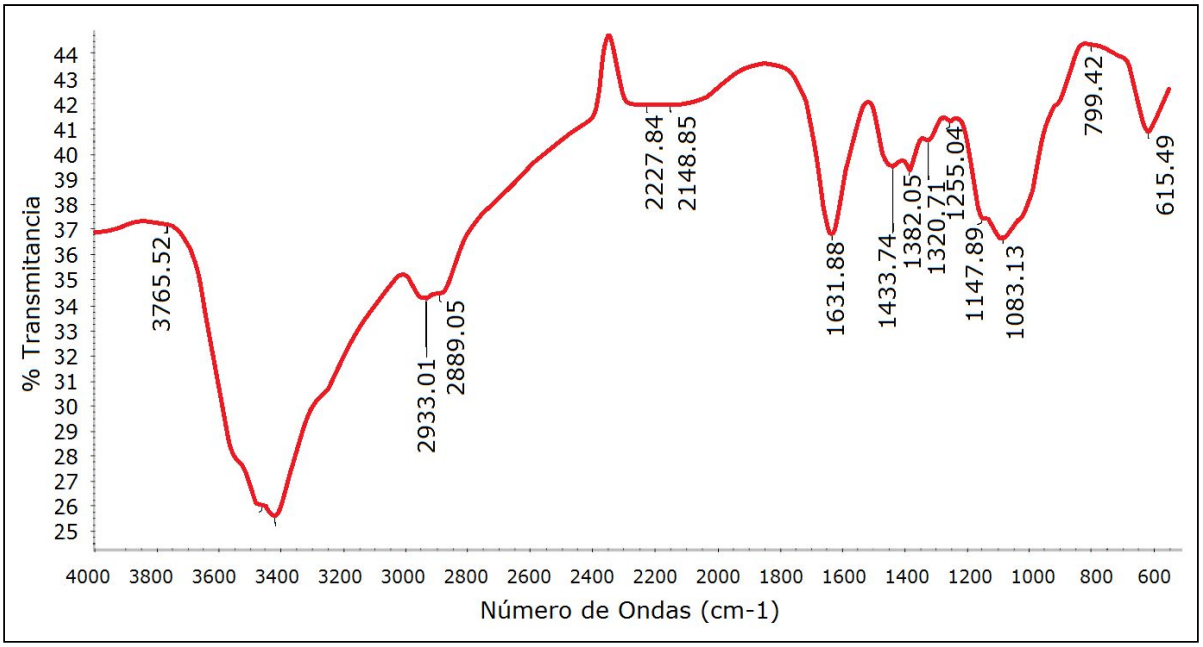


Figura 48. Lectura del espectro infrarrojo utilizando la transformada de Fourier (FTIR).

La Figura 48 nos muestra el espectro IR de la muestra de quitosano. Mediante el software del equipo se calculó las absorbancias para las frecuencias cercanas a 1320 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} resultando un valor de 0,0029 para la frecuencia de 1320,71 cm^{-1} (Figura 49) y 0,0096 para la frecuencia de 1433,74 cm^{-1} (Figura 50).

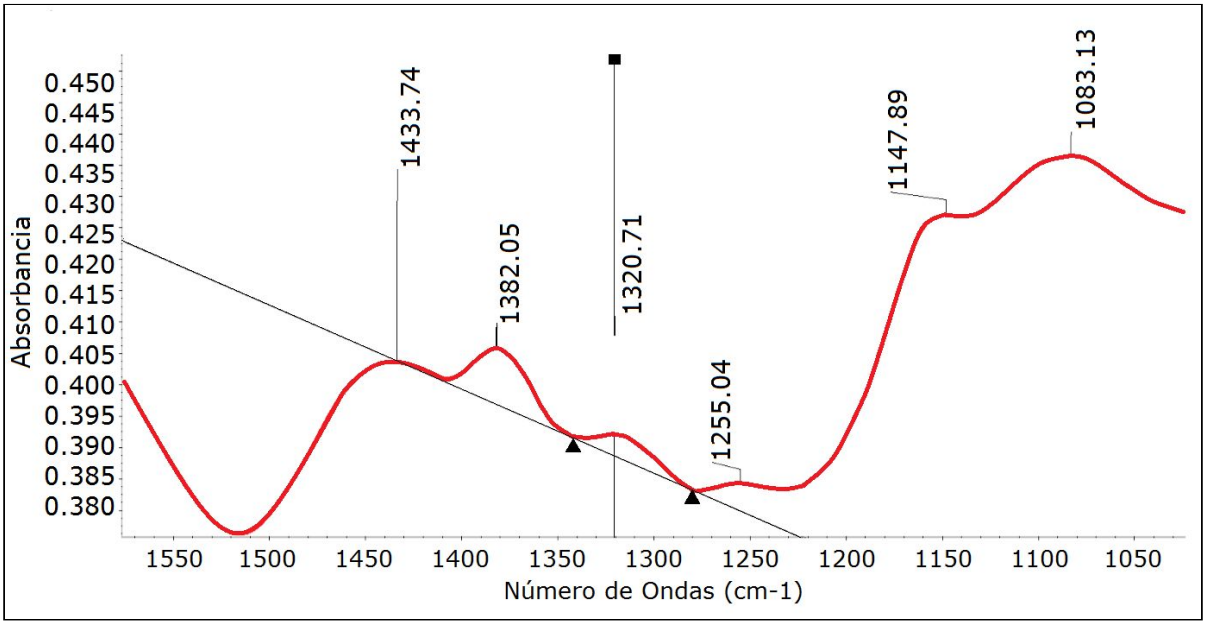


Figura 49. Cálculo del valor de la absorbancia para la frecuencia cercana a 1320 cm^{-1}.

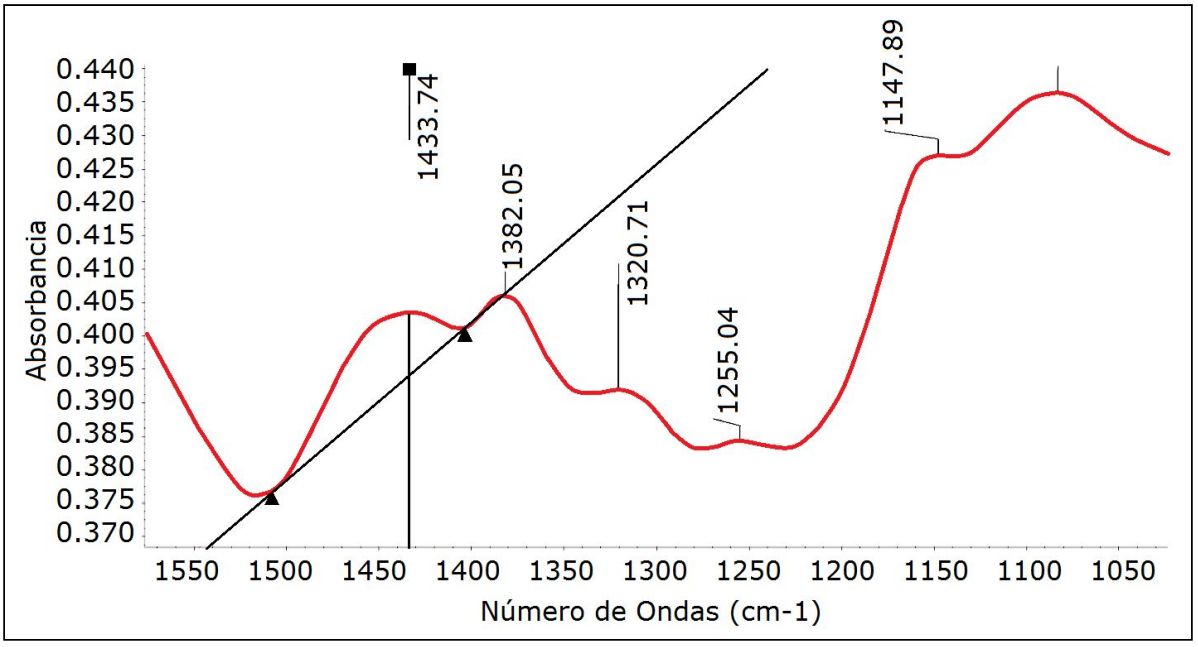


Figura 50. Cálculo del valor de la absorbancia para la frecuencia cercana a 1420 cm^{-1}.

El grado de desacetilación (GD) para el quitosano se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$\%GD = 87{,}8 - 31{,}92\,\frac{A_{1320}}{A_{1420}}$$

$$\%GD = 87{,}8 - 31{,}92\,\frac{0{,}0029}{0{,}0096}$$

$$\%GD = 78{,}2\%$$

Anexo 8. Cálculo del peso molecular del quitosano.

El peso molecular del quitosano se determinó mediante la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K(\overline{M})^{\alpha}$$

Los valores de las constante K y α se hallaron luego de conocer el grado de desacetilación del quitosano. De la siguiente relación se obtuvo las constantes:

$$K = 1{,}64 \times 10^{-30} \times (\%GD)^{14}$$

$$K = 1{,}64 \times 10^{-30} \times (78{,}2)^{14}$$

$$K = 5{,}2449 \text{ x } 10^{-4}$$

$$\alpha = 1{,}82 - 1{,}02 \times 10^{-2} \times (\%GD)$$

$$\alpha = 1{,}82 - 1{,}02 \times 10^{-2} \times (78{,}2)$$

$$\alpha = 1{,}02236$$

Reemplazando los valores de las constantes K, α y la viscosidad intrínseca en la ecuación de Mark-Houwink se obtiene el valor del peso molecular $(\overline{M})$ para el quitosano expresado en kilodaltons (kDa).

$$[\eta] = K(\overline{M})^{\alpha}$$
$$602 = 5{,}2449 \times 10^{-4}\,(\overline{M})^{1{,}02236}$$
$$\overline{M} = 845{,}91 \text{ kDa}$$

Anexo 9. Determinación del rendimiento de la chirimoya.

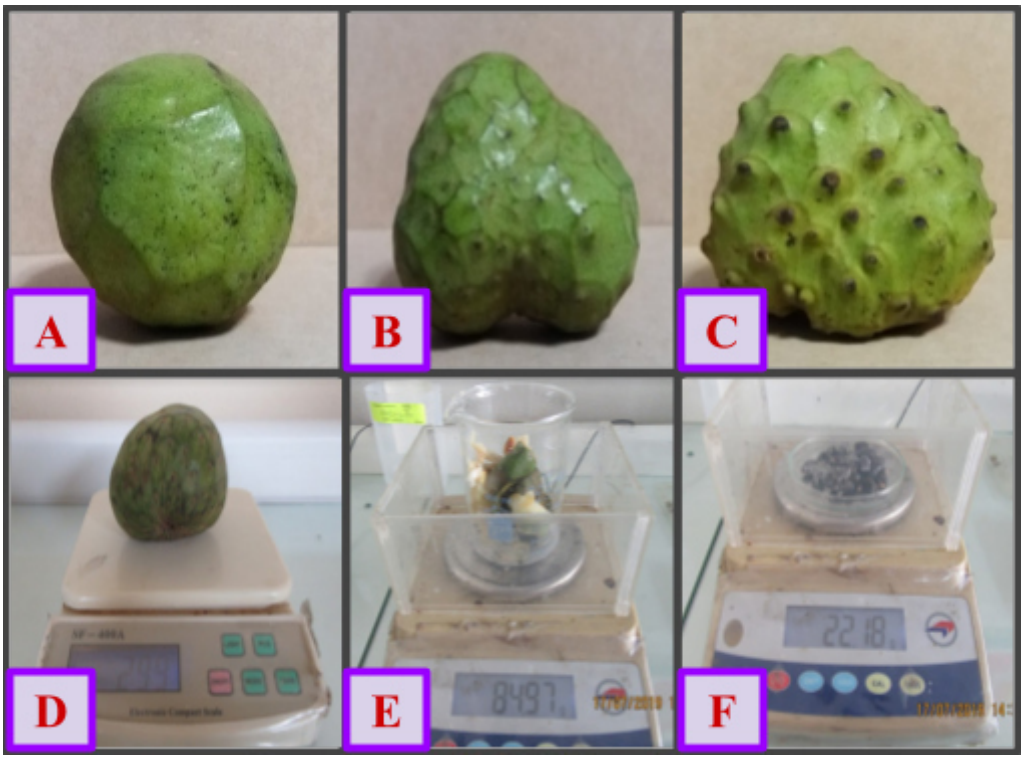


Figura 51. Rendimiento de la chirimoya.

El rendimiento del fruto se realizó, por cuadruplicado, para las tres variedades de chirimoya.

A) Chirimoya variedad Lisa.
B) Chirimoya variedad Impresa.
C) Chirimoya variedad Umbonata.
D) Peso del fruto entero de chirimoya.
E) Peso de la cáscara de chirimoya.
F) Peso de la pepa de chirimoya.

Anexo 10. Resultados del rendimiento del fruto en la selección de la variedad.

Tabla 39

Resultados del rendimiento de la chirimoya en la selección de la variedad

Variedad	Repeticiones	% Rendimiento		
		Cáscara	Pepa	Pulpa
Lisa	R1	27,29	3,02	69,69
	R2	25,17	2,40	71,23
	R3	27,62	3,09	67,40
	R4	25,16	2,88	71,95
	Promedio	**26,31**	**3,10**	**70,07**
Impresa	R1	28,42	7,42	64,16
	R2	29,67	6,72	65,24
	R3	28,69	7,59	59,46
	R4	27,81	6,92	66,08
	Promedio	**28,65**	**7,16**	**63,74**
Umbonata	R1	28,00	6,50	68,86
	R2	30,26	5,73	64,01
	R3	28,14	6,81	65,05
	R4	30,52	6,00	67,57
	Promedio	**29,23**	**6,26**	**66,37**

Anexo 11. Determinación de la curva patrón de ácido gálico.

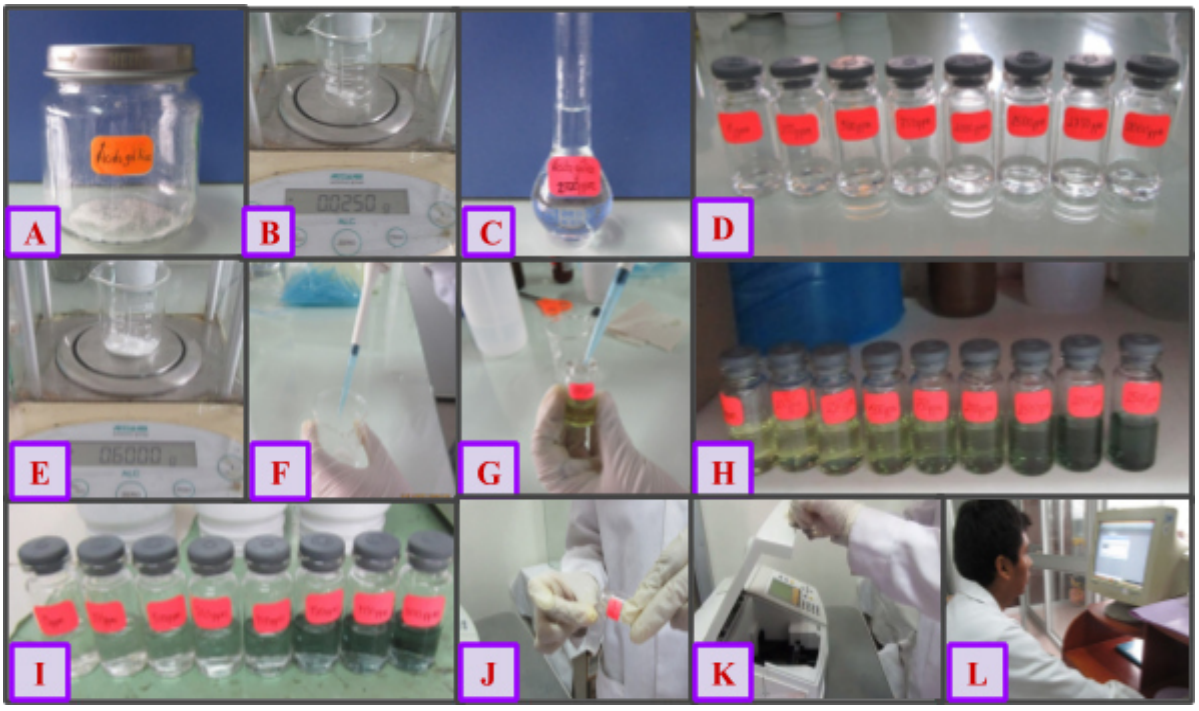


Figura 52. Determinación de la curva patrón de ácido gálico.

A) Reactivo de ácido gálico.
B) Peso exacto del ácido gálico.
C) Solución patrón de ácido gálico a 2500 ppm.
D) Disoluciones de ácido gálico (0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750 y 2000 ppm).
E) Peso exacto del carbonato de sodio.
F) Preparación de la solución de Na_2CO_3 al 7,5%.
G) Adición del reactivo Folin Ciocalteu a cada disolución de ácido gálico.
H) Reacción entre el Folin Ciocalteu y el Na_2CO_3 durante 2,5 h en oscuridad.
I) Viales con las disoluciones de ácido gálico luego del tiempo de reacción.
J) Adición de la muestra de ácido gálico diluido a la celda espectrofotométrica.
K) Uso del espectrofotómetro UV-Vis.
L) Lectura de las muestras diluidas de ácido gálico.

- **Descripción procedimental.**

A) Se pesó 0,025 g de ácido gálico en un beaker.
B) Se preparó una solución patrón de 2500 ppm en una fiola de 10 ml.
C) Se realizó las siguientes diluciones en viales de 10 ml:

Tabla 40
Diluciones a partir de la solución patrón de ácido gálico a 2500 ppm

Concentración (ppm)	Vol. de solución patrón (µL)	Vol. de agua destilada (µL)	Vol. total (ml)
0	0	1000	1
250	100	900	1
500	200	800	1
750	300	700	1
1000	400	600	1
1500	600	400	1
1750	700	300	1
2000	800	200	1

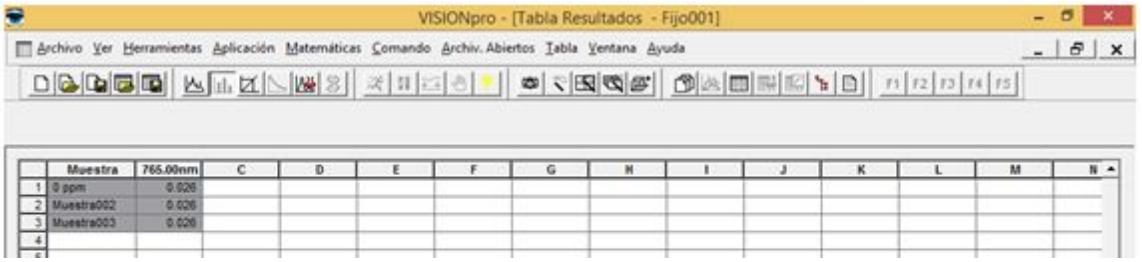
D) Se preparó una solución de Na_2CO_3 al 7,5%. Para ello se pesó 0,6000 g de carbonato de sodio en un beaker, se añadió 7,4 ml de agua destilada. Finalmente se sonicó durante 5 min para su completa disolución.

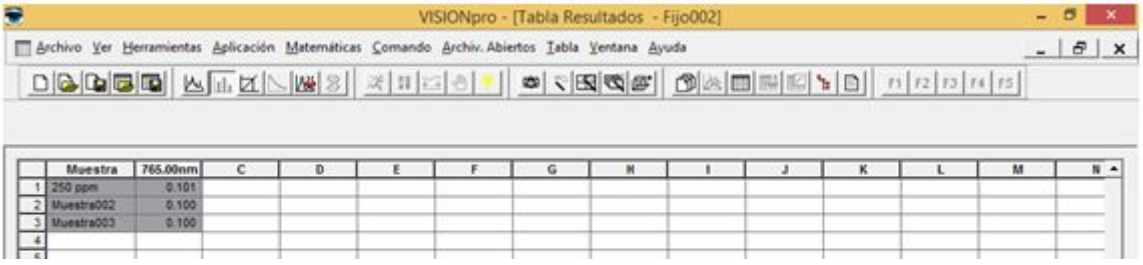
E) Para su lectura se añadió a cada vial el siguiente orden de reactivos:

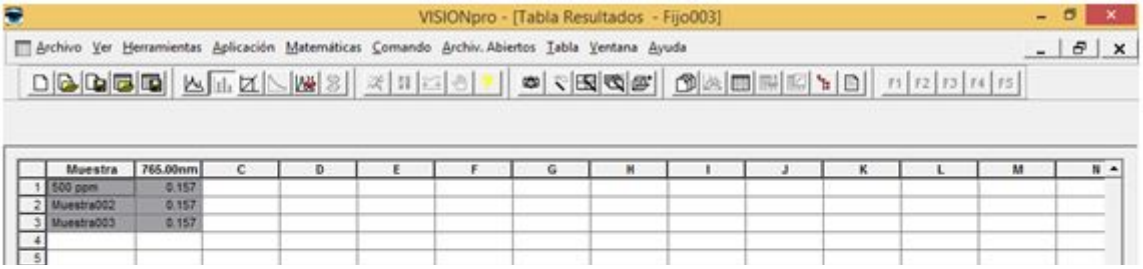
- 3,95 ml de agua destilada
- 50 µL de cada disolución de ácido gálico
- 250 µL del reactivo Folin Ciocalteu (reposar en oscuridad durante 8 min)
- 750 µL de Na_2CO_3 al 7,5%, agitar y dejar reposar durante 2,5 h en oscuridad
- Durante las 2 h las muestras cambian de coloración de amarillo a azul

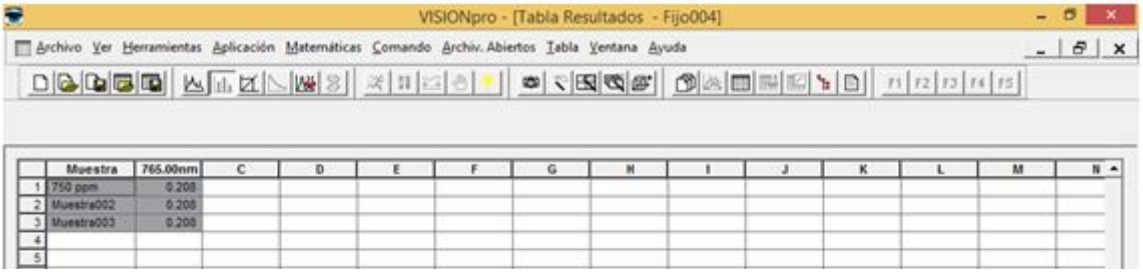
F) Se realizaron las lecturas de las disoluciones a diferente concentración del ácido gálico (8 viales). Se midió la absorbancia a 765 nm.

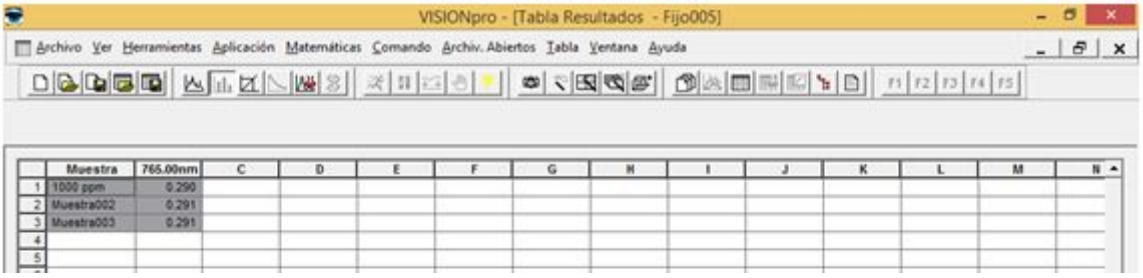
G) Las imágenes de la lecturas se colocan a continuación:

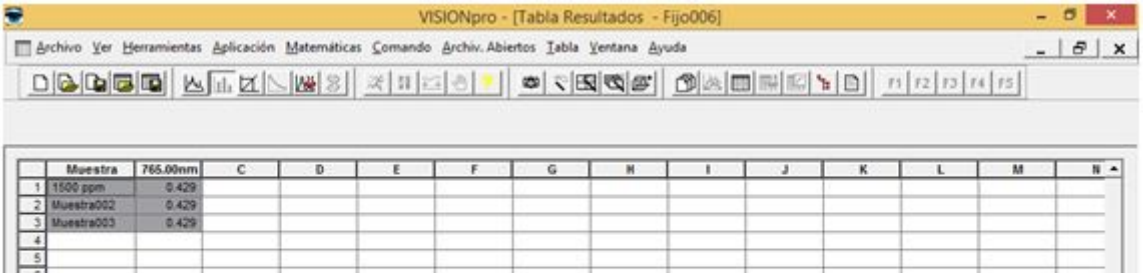












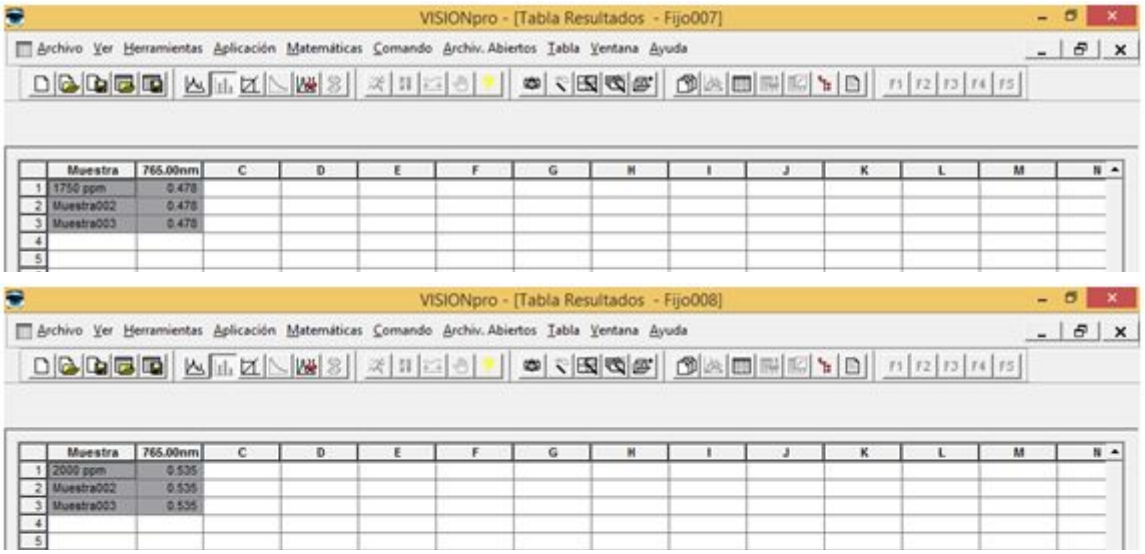


Figura 53. Lectura de la absorbancia a 765 nm de la disolución de ácido gálico a 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750 y 2000 ppm.

Se realizó la curva patrón de ácido gálico mediante la Figura 61, Concentración vs Absorbancia, tomando en cuenta diluciones de concentración 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm y 2000 ppm para obtener un R^2 de mayor confiabilidad.

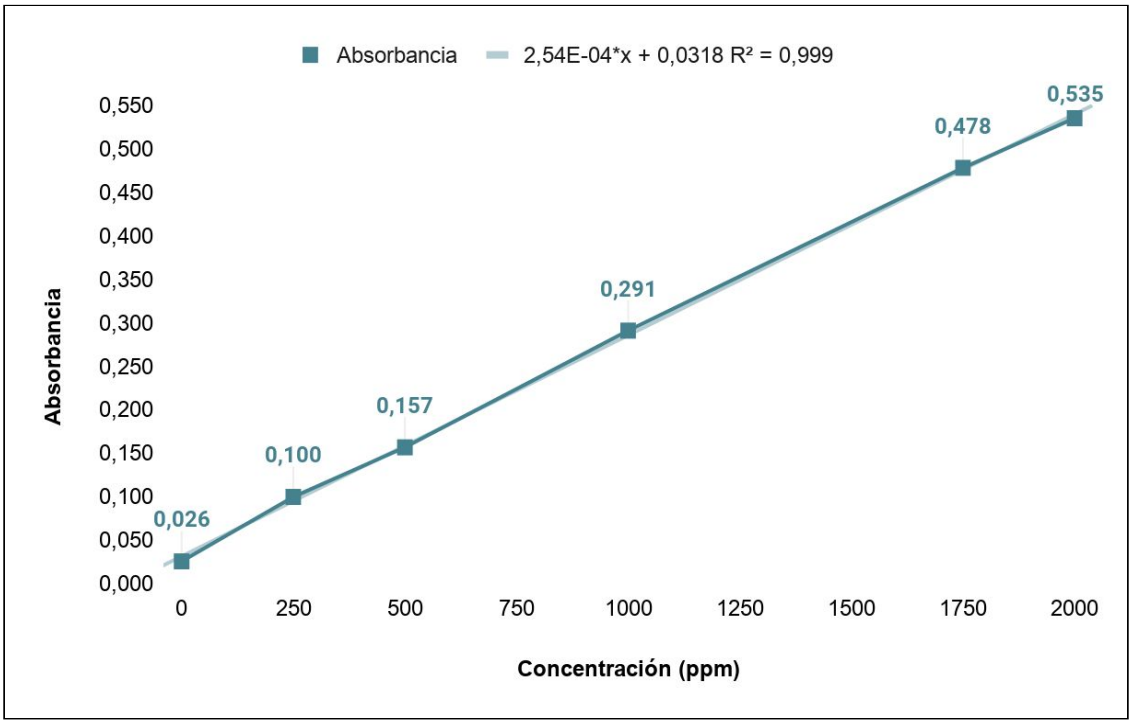


Figura 54. Curva patrón de ácido gálico.

Anexo 12. Destilación de etanol.

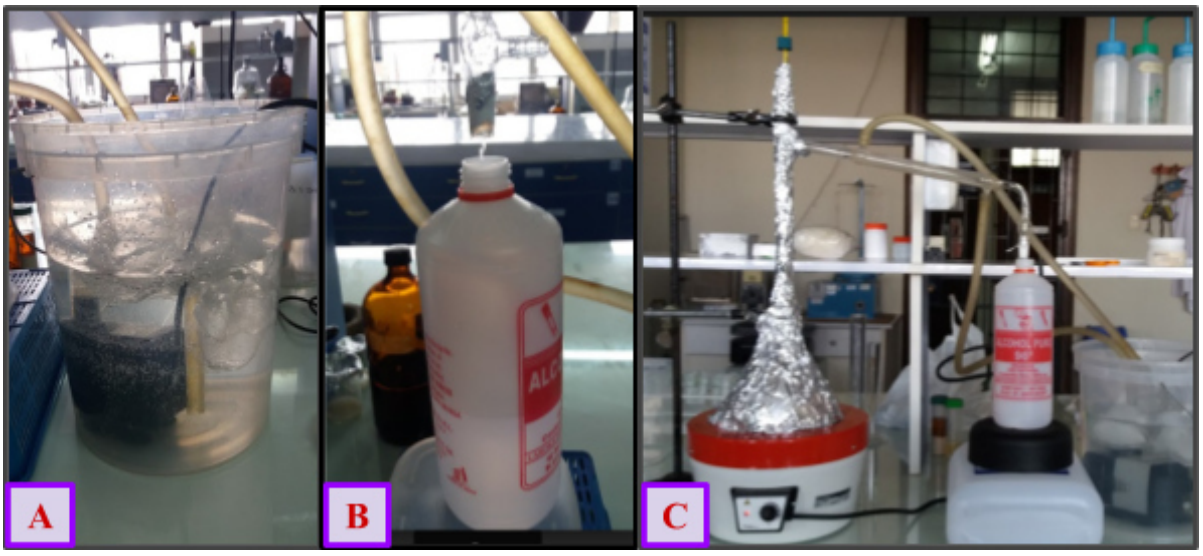


Figura 55. Destilación del etanol.

A) Reflujo del agua para la destilación.
B) Etanol puro destilado.
C) Equipo de destilación completo y en operación.

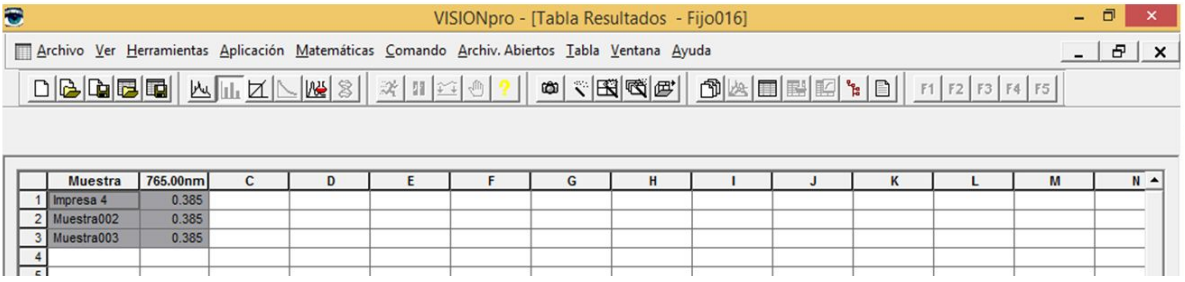
Anexo 13. Determinación del contenido de polifenoles totales en la pulpa de chirimoya.

Figura 56. Determinación del contenido de polifenoles totales en la pulpa de chirimoya.

A) Peso aproximado (2,5 g) de la pulpa de chirimoya.
B) Homogeneización durante 2 min de la pulpa con etanol (5 ml) en relación de 1:2.
C) Se vertió el contenido homogeneizado en tela de organza.
D) Filtrado y extracción del contenido polifenólico.
E) Muestras rotuladas provenientes de la extracción de los compuestos polifenólicos.
F) Adición de 3,9 ml de agua destilada.
G) Adición de 50 µL del extracto etanólico.
H) Adición de 250 µL del reactivo Folin Ciocalteu (reposo durante 8 min a oscuridad).
I) Adición de 750 µL del Na_2CO_3 al 7,5% (reacción durante 2,5 h a oscuridad).
J) Cambio de coloración luego de las 2,5 h de reacción.
K) Lectura a 765 nm cada una de las muestras en el espectrofotómetro.

- **Ejemplo del cálculo del contenido de polifenoles totales en la pulpa de chirimoya.**

Se pesó aproximadamente 2,5 g de pulpa de chirimoya en un vaso de vidrio (anotando el peso exacto). Luego se sigue el procedimiento tal y como se describió hasta la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro (Ver Figura 64) donde finalmente este valor se sustituye en la ordenada "Y" de la ecuación patrón (Y = 0,000254 X + 0,0318) obtenida de la curva de calibración con ácido gálico.



	Muestra	765.00nm	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Impresa 4	0.385												
2	Muestra002	0.385												
3	Muestra003	0.385												
4														

Figura 57. Lectura de la absorbancia a 765 nm de la pulpa de chirimoya.

Luego de reemplazar el valor de la absorbancia (0,385) en la ecuación patrón, despejamos la variable X, obteniendo de esta manera la concentración de ácido gálico presente en la pulpa de chirimoya.

$$Y = 0{,}000254\,X + 0{,}0318$$
$$0{,}385 = 0{,}000254\,X + 0{,}0318$$
$$X = 1390{,}55 \text{ ppm}$$

Este resultado se interpreta que existe 1390,55 mg/L de ácido gálico en la pulpa de chirimoya. Para lograr expresar los resultados como mg de ácido gálico por 100g de pulpa fresca, tenemos que tener en cuenta la cantidad exacta de disolvente de extracción (etanol) y la cantidad de muestra que se utilizó para el análisis. Para todas las evaluaciones de polifenoles totales se tomó 5 ml de etanol con 2,5 g aproximadamente de pulpa (Se anotó el peso exacto).

Para nuestro ejemplo el peso exacto para la variedad Impressa (4ta repetición) en la evaluación de la selección de la variedad apropiada fue de 2,3447 g. Por lo que se calcularía de la siguiente manera:

$$\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{100 g de pulpa}} = \frac{\text{1390,55 mg ác. gál}}{\text{1000 ml}} \times \frac{\text{5 ml de disolvente}}{\text{2,3447 g}} \times 100$$

$$\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{100 g de pulpa}} = 296{,}53$$

Todos los resultados sobre el contenido de polifenoles totales evaluados durante la selección de la variedad apropiada y en el estudio de la actividad sinérgica fueron interpretados de esta manera.

Anexo 14. Resultados del contenido de polifenoles totales en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 41

Resultados del contenido de polifenoles totales en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica.

Variedad	Repeticiones	Contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/100g de muestra fresca)
Lisa	R1	219,8
	R2	221,03
	R3	205,82
	R4	225,42
	Promedio	**218,03**
Impresa	R1	285,25
	R2	283,73
	R3	289,44
	R4	296,53
	Promedio	**288,74**
Umbonata	R1	272,13
	R2	283,62
	R3	290,40
	R4	280,52
	Promedio	**281,67**

Día 0

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,331	1177,95	2,5844	5	227,90
Blanco 2	0,318	1126,77	2,5873	5	217,75
Blanco 3	0,353	1264,57	2,9830	5	211,96
3% AC 1	0,350	1252,76	2,8210	5	222,04
3% AC 2	0,367	1319,69	3,0744	5	214,62
3% AC 3	0,320	1134,65	2,5726	5	220,53
0,75% CS 1	0,319	1130,71	2,5984	5	217,58
0,75% CS 2	0,336	1197,64	2,7275	5	219,55
0,75% CS 3	0,328	1166,14	2,6686	5	218,49
0,75% CS + 3% AC 1	0,316	1118,90	2,5627	5	218,30
0,75% CS + 3% AC 2	0,319	1130,71	2,5579	5	221,02
0,75% CS + 3% AC 3	0,322	1142,52	2,5865	5	220,86

Día 20

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,322	1142,52	2,8294	5	201,90
Blanco 2	0,289	1012,60	2,7371	5	184,98
Blanco 3	0,306	1079,53	2,7576	5	195,74
3% AC 1	0,292	1024,41	2,6354	5	194,36
3% AC 2	0,307	1083,46	2,6116	5	207,43
3% AC 3	0,332	1181,89	2,7440	5	215,36
0,75% CS 1	0,346	1237,01	3,2044	5	193,02
0,75% CS 2	0,312	1103,15	2,7261	5	202,33
0,75% CS 3	0,307	1083,46	2,6598	5	203,67
0,75% CS + 3% AC 1	0,339	1209,45	3,0620	5	197,49
0,75% CS + 3% AC 2	0,340	1213,39	2,7049	5	224,29
0,75% CS + 3% AC 3	0,323	1146,46	2,8760	5	199,31

Día 40

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,328	1166,14	3,2935	5	177,04
Blanco 2	0,278	969,29	2,6972	5	179,68
Blanco 3	0,27	937,80	2,4214	5	193,65
3% AC 1	0,281	981,10	2,4404	5	201,01
3% AC 2	0,290	1016,54	2,4109	5	210,82
3% AC 3	0,294	1032,28	2,8152	5	183,34
0,75% CS 1	0,276	961,42	2,3414	5	205,31
0,75% CS 2	0,301	1059,84	2,6033	5	203,56
0,75% CS 3	0,259	894,49	2,3800	5	187,92
0,75% CS + 3% AC 1	0,286	1000,79	2,4867	5	201,23
0,75% CS + 3% AC 2	0,309	1091,34	2,3649	5	230,74
0,75% CS + 3% AC 3	0,271	941,73	2,2955	5	205,13

Día 60

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,281	981,10	2,7370	5	179,23
Blanco 2	0,210	701,57	2,1450	5	163,54
Blanco 3	0,218	733,07	2,1216	5	172,76
3% AC 1	0,254	874,80	2,2005	5	198,77
3% AC 2	0,270	937,80	2,4392	5	192,23
3% AC 3	0,255	878,74	2,4444	5	179,75
0,75% CS 1	0,310	1095,28	2,6520	5	206,50
0,75% CS 2	0,241	823,62	2,2566	5	182,49
0,75% CS 3	0,227	768,50	2,1899	5	175,47
0,75% CS + 3% AC 1	0,235	800,00	2,0940	5	191,02
0,75% CS + 3% AC 2	0,251	862,99	2,0654	5	208,92
0,75% CS + 3% AC 3	0,262	906,30	2,3195	5	195,37

Día 80

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,222	748,82	2,5416	5	147,31
Blanco 2	0,271	941,73	2,7264	5	172,71
Blanco 3	0,242	827,56	2,5729	5	160,82
3% AC 1	0,283	988,98	2,7596	5	179,19
3% AC 2	0,273	949,61	2,6221	5	181,08
3% AC 3	0,273	949,61	2,6743	5	177,54
0,75% CS 1	0,275	957,48	2,5786	5	185,66
0,75% CS 2	0,290	1016,54	2,8481	5	178,46
0,75% CS 3	0,279	973,23	2,6779	5	181,71
0,75% CS + 3% AC 1	0,283	988,98	2,5563	5	193,44
0,75% CS + 3% AC 2	0,310	1095,28	3,0253	5	181,02
0,75% CS + 3% AC 3	0,298	1048,03	2,7274	5	192,13

Día 100

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,274	953,54	2,9693	5	160,57
Blanco 2	0,232	788,19	2,3448	5	168,07
Blanco 3	0,208	693,70	2,1108	5	164,32
3% AC 1	0,214	717,32	2,0038	5	178,99
3% AC 2	0,227	768,50	2,1281	5	180,56
3% AC 3	0,235	800,00	2,4093	5	166,02
0,75% CS 1	0,228	772,44	2,4478	5	157,78
0,75% CS 2	0,238	811,81	2,4833	5	163,45
0,75% CS 3	0,227	768,50	2,1746	5	176,70
0,75% CS + 3% AC 1	0,28	977,17	2,6989	5	181,03
0,75% CS + 3% AC 2	0,218	733,07	2,0393	5	179,74
0,75% CS + 3% AC 3	0,256	882,68	2,3699	5	186,23

Día 120

Tratamiento	Absorbancia	ppm	masa (g)	Volumen (ml)	Polifenoles totales
Blanco 1	0,340	1213,39	3,5830	5	169,33
Blanco 2	0,346	1237,01	3,4572	5	178,90
Blanco 3	0,243	831,50	2,5613	5	162,32
3% AC 1	0,364	1307,87	3,1910	5	204,93
3% AC 2	0,273	949,61	2,6947	5	176,20
3% AC 3	0,318	1126,77	3,2245	5	174,72
0,75% CS 1	0,309	1091,34	3,1839	5	171,38
0,75% CS 2	0,354	1268,50	3,4088	5	186,06
0,75% CS 3	0,330	1174,02	3,3093	5	177,38
0,75% CS + 3% AC 1	0,371	1335,43	3,2789	5	203,64
0,75% CS + 3% AC 2	0,365	1311,81	3,5662	5	183,92
0,75% CS + 3% AC 3	0,277	965,35	2,5584	5	188,66

Anexo 15. Análisis de la acidez titulable en la pulpa de chirimoya.

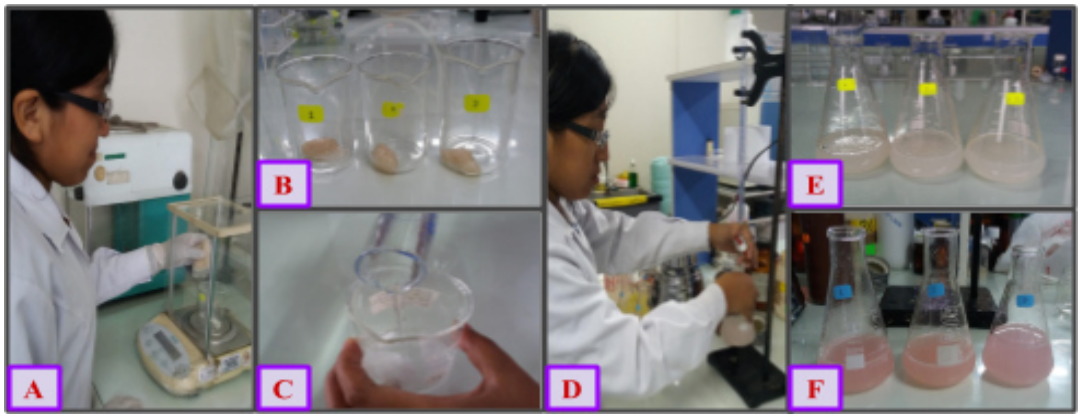


Figura 58. Proceso para obtener la acidez titulable de cada pulpa de chirimoya tratada.

A) Pesado de la pulpa de chirimoya en un vaso precipitado de 100 ml.
B) Muestras de pulpa de chirimoya con un peso de 3,5 g aproximadamente.
C) Trasvase de la pulpa al matraz de 250 ml.
D) Proceso de titulación realizado para cada tratamiento en estudio.
E) Muestras, por triplicado, de cada tratamiento estudiado antes del proceso de titulación.
F) Muestras, por triplicado, de cada tratamiento estudiado después del proceso de titulación.

Anexo 16. Resultados de la acidez titulable en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 42

Resultados de la acidez titulable en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica

Variedad	Repeticiones	Acidez titulable (mEq-g de ácido cítrico/100 g de muestra fresca)
Lisa	R1	0,29
	R2	0,3
	R3	0,31
	R4	0,29
	Promedio	**0,30**
Impresa	R1	0,27
	R2	0,27
	R3	0,28
	R4	0,28
	Promedio	**0,28**
Umbonata	R1	0,32
	R2	0,30
	R3	0,33
	R4	0,30
	Promedio	**0,31**

Día 0

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	3,6145	1,95	0,0984	0,006404	0,34
Blanco 2	3,7077	1,90	0,0984	0,006404	0,32
Blanco 3	3,5917	1,80	0,0984	0,006404	0,32
3% AC 1	6,1312	4,10	0,0984	0,006404	0,42
3% AC 2	3,3747	2,20	0,0984	0,006404	0,41
3% AC 3	4,3204	2,80	0,0984	0,006404	0,41
0,75% CS 1	3,5363	1,80	0,0984	0,006404	0,32
0,75% CS 2	4,2634	2,10	0,0984	0,006404	0,31
0,75% CS 3	4,6528	2,30	0,0984	0,006404	0,31
0,75% CS + 3% AC 1	3,6006	2,55	0,0984	0,006404	0,45
0,75% CS + 3% AC 2	3,5228	2,50	0,0984	0,006404	0,45
0,75% CS + 3% AC 3	4,1205	2,90	0,0984	0,006404	0,44

Día 20

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	4,9168	2,30	0,0984	0,006404	0,29
Blanco 2	4,9249	2,30	0,0984	0,006404	0,29
Blanco 3	5,1393	2,40	0,0984	0,006404	0,29
3% AC 1	4,1549	2,70	0,0984	0,006404	0,41
3% AC 2	4,4157	2,90	0,0984	0,006404	0,41
3% AC 3	4,4404	2,80	0,0984	0,006404	0,40
0,75% CS 1	3,5450	1,90	0,0984	0,006404	0,34
0,75% CS 2	3,6602	1,85	0,0984	0,006404	0,32
0,75% CS 3	3,6500	1,80	0,0984	0,006404	0,31
0,75% CS + 3% AC 1	3,4726	2,55	0,0984	0,006404	0,46
0,75% CS + 3% AC 2	3,9595	2,85	0,0984	0,006404	0,45
0,75% CS + 3% AC 3	3,5372	2,60	0,0984	0,006404	0,46

Día 40

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	5,2693	2,70	0,0984	0,006404	0,32
Blanco 2	5,1450	2,60	0,0984	0,006404	0,32
Blanco 3	6,2903	3,20	0,0984	0,006404	0,32
3% AC 1	5,1223	3,60	0,0984	0,006404	0,44
3% AC 2	4,5629	3,10	0,0984	0,006404	0,43
3% AC 3	4,9846	3,45	0,0984	0,006404	0,44
0,75% CS 1	4,7330	2,40	0,0984	0,006404	0,32
0,75% CS 2	4,4962	2,20	0,0984	0,006404	0,31
0,75% CS 3	4,5471	2,30	0,0984	0,006404	0,32
0,75% CS + 3% AC 1	5,2921	3,70	0,0984	0,006404	0,44
0,75% CS + 3% AC 2	6,1329	4,30	0,0984	0,006404	0,44
0,75% CS + 3% AC 3	6,1162	4,40	0,0984	0,006404	0,45

Día 60

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	3,7781	1,70	0,1051	0,006404	0,30
Blanco 2	3,9325	1,70	0,1051	0,006404	0,29
Blanco 3	3,9437	1,75	0,1051	0,006404	0,30
3% AC 1	4,2975	2,50	0,1051	0,006404	0,39
3% AC 2	4,4135	2,70	0,1051	0,006404	0,41
3% AC 3	4,8663	2,90	0,1051	0,006404	0,40
0,75% CS 1	4,2815	1,90	0,1051	0,006404	0,30
0,75% CS 2	4,3271	1,90	0,1051	0,006404	0,30
0,75% CS 3	4,6211	2,10	0,1051	0,006404	0,31
0,75% CS + 3% AC 1	4,2040	2,60	0,1051	0,006404	0,42
0,75% CS + 3% AC 2	4,0062	2,55	0,1051	0,006404	0,43
0,75% CS + 3% AC 3	4,6859	3,00	0,1051	0,006404	0,43

Día 80

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	3,2176	1,50	0,0984	0,006404	0,29
Blanco 2	3,4885	1,65	0,0984	0,006404	0,30
Blanco 3	3,0021	1,30	0,0984	0,006404	0,27
3% AC 1	3,2470	2,05	0,0984	0,006404	0,40
3% AC 2	3,2960	2,00	0,0984	0,006404	0,38
3% AC 3	3,2546	1,95	0,0984	0,006404	0,38
0,75% CS 1	2,9794	1,30	0,0984	0,006404	0,27
0,75% CS 2	3,0494	1,30	0,0984	0,006404	0,27
0,75% CS 3	2,9816	1,35	0,0984	0,006404	0,29
0,75% CS + 3% AC 1	3,2290	2,15	0,0984	0,006404	0,42
0,75% CS + 3% AC 2	3,5446	2,30	0,0984	0,006404	0,41
0,75% CS + 3% AC 3	3,1878	2,15	0,0984	0,006404	0,43

Día 100

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	3,8172	1,75	0,0984	0,006404	0,29
Blanco 2	3,7699	1,70	0,0984	0,006404	0,28
Blanco 3	5,1125	2,30	0,0984	0,006404	0,28
3% AC 1	3,2962	1,95	0,0984	0,006404	0,37
3% AC 2	4,7080	2,80	0,0984	0,006404	0,37
3% AC 3	6,1999	3,85	0,0984	0,006404	0,39
0,75% CS 1	3,0840	1,35	0,0984	0,006404	0,28
0,75% CS 2	4,2008	1,80	0,0984	0,006404	0,27
0,75% CS 3	4,1987	1,90	0,0984	0,006404	0,29
0,75% CS + 3% AC 1	3,3579	2,20	0,0984	0,006404	0,41
0,75% CS + 3% AC 2	4,8271	3,20	0,0984	0,006404	0,42
0,75% CS + 3% AC 3	5,6373	3,90	0,0984	0,006404	0,44

Día 120

Tratamiento	masa (g)	vol NaOH (ml)	[ ] de NaOH	Factor ac. cítrico	Acidez titulable
Blanco 1	3,7009	1,50	0,0984	0,006404	0,26
Blanco 2	3,7333	1,50	0,0984	0,006404	0,25
Blanco 3	3,8794	1,60	0,0984	0,006404	0,26
3% AC 1	3,6676	2,20	0,0984	0,006404	0,38
3% AC 2	3,5492	2,20	0,0984	0,006404	0,39
3% AC 3	3,6200	2,25	0,0984	0,006404	0,39
0,75% CS 1	3,8303	1,80	0,0984	0,006404	0,30
0,75% CS 2	3,5088	1,50	0,0984	0,006404	0,27
0,75% CS 3	3,2345	1,30	0,0984	0,006404	0,25
0,75% CS + 3% AC 1	3,5678	2,50	0,0984	0,006404	0,44
0,75% CS + 3% AC 2	3,7782	2,60	0,0984	0,006404	0,43
0,75% CS + 3% AC 3	3,6585	2,45	0,0984	0,006404	0,42

Anexo 17. Análisis de los sólidos solubles totales en la pulpa de chirimoya.

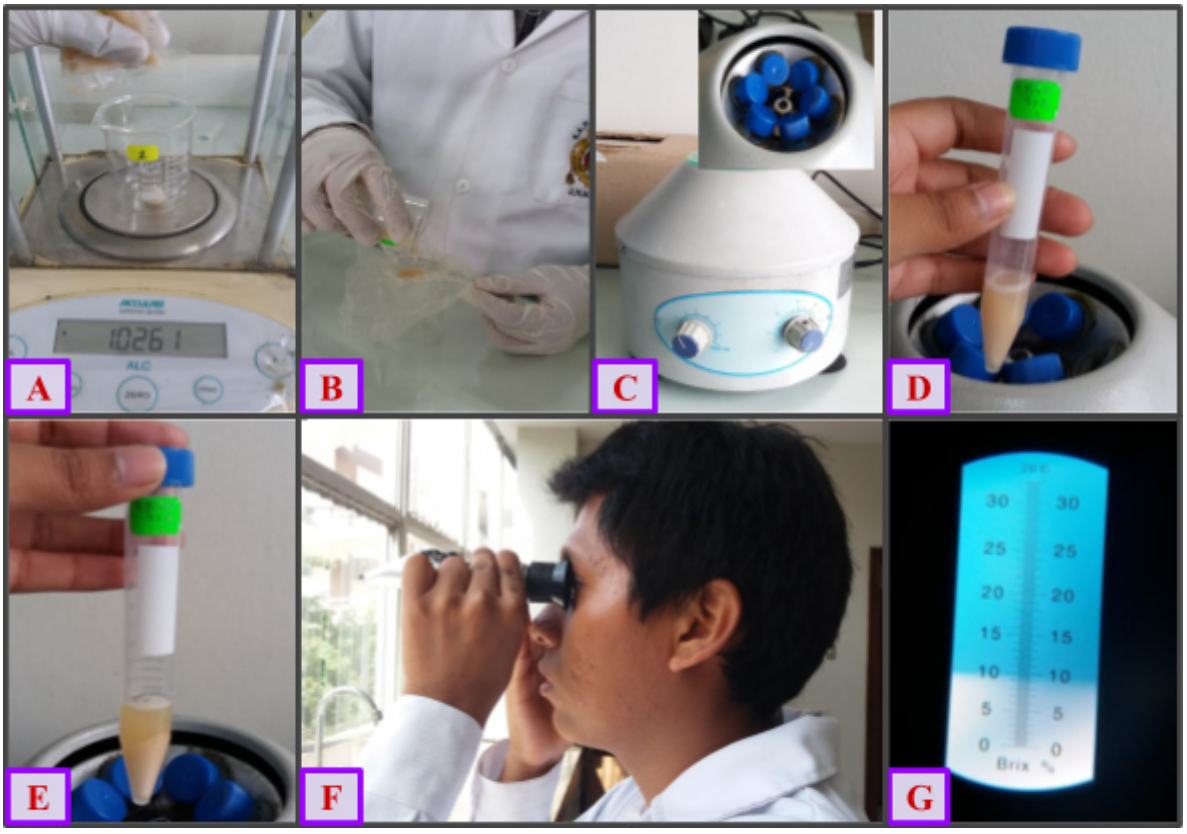


Figura 59. Proceso para obtener los sólidos solubles totales de cada pulpa de chirimoya tratada.

A) Pesado de pulpa de chirimoya (5 g aproximadamente).
B) Filtrado de la pulpa de chirimoya diluida y homogenizada en 5 ml de agua destilada.
C) Centrifugado de la mezcla a 2000 rpm durante 20 min.
D) Mezcla de pulpa + agua destilada antes de ser centrifugado.
E) Mezcla de pulpa + agua destilada luego de ser centrifugado.
F) Lectura de los sólidos solubles totales en un refractómetro con escala de 0-30%.
G) Visualización de los sólidos solubles totales expresado en °Brix.

Anexo 18. Resultados de los sólidos solubles totales en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 43

Resultados de los sólidos solubles totales (°Brix) en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica

Variedad	Repeticiones	Sólidos solubles totales (°Brix)
Lisa	R1	19,8
	R2	20,0
	R3	20,2
	R4	19,2
	Promedio	**19,8**
Impresa	R1	17,4
	R2	17,8
	R3	17,8
	R4	17,8
	Promedio	**17,7**
Umbonata	R1	20,0
	R2	19,6
	R3	20,0
	R4	19,8
	Promedio	**19,9**

.

Día 0

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	18,0
Blanco 2	18,4
Blanco 3	18,4
3% AC 1	18,4
3% AC 2	18,0
3% AC 3	18,0
0,75% CS 1	18,4
0,75% CS 2	18,4
0,75% CS 3	18,0
0,75% CS + 3% AC 1	20,0
0,75% CS + 3% AC 2	20,0
0,75% CS + 3% AC 3	19,8

Día 20

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	19,2
Blanco 2	19,8
Blanco 3	19,0
3% AC 1	19,0
3% AC 2	19,2
3% AC 3	18,8
0,75% CS 1	18,8
0,75% CS 2	19,0
0,75% CS 3	18,6
0,75% CS + 3% AC 1	19,6
0,75% CS + 3% AC 2	19,8
0,75% CS + 3% AC 3	19,6

Día 40

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	18,4
Blanco 2	18,8
Blanco 3	18,0
3% AC 1	18,8
3% AC 2	19,2
3% AC 3	18,4
0,75% CS 1	17,2
0,75% CS 2	18,0
0,75% CS 3	18,0
0,75% CS + 3% AC 1	18,4
0,75% CS + 3% AC 2	18,8
0,75% CS + 3% AC 3	18,4

Día 60

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	20,4
Blanco 2	19,6
Blanco 3	20,0
3% AC 1	18,8
3% AC 2	18,0
3% AC 3	18,4
0,75% CS 1	18,0
0,75% CS 2	18,4
0,75% CS 3	18,4
0,75% CS + 3% AC 1	20,4
0,75% CS + 3% AC 2	20,4
0,75% CS + 3% AC 3	20,0

Día 80

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	21,6
Blanco 2	20,8
Blanco 3	20,8
3% AC 1	20,8
3% AC 2	20,4
3% AC 3	20,4
0,75% CS 1	20,0
0,75% CS 2	20,0
0,75% CS 3	20,2
0,75% CS + 3% AC 1	20,4
0,75% CS + 3% AC 2	20,4
0,75% CS + 3% AC 3	20,8

Día 100

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	21,6
Blanco 2	20,8
Blanco 3	20,8
3% AC 1	20,0
3% AC 2	20,0
3% AC 3	20,0
0,75% CS 1	20,6
0,75% CS 2	20,5
0,75% CS 3	20,5
0,75% CS + 3% AC 1	19,6
0,75% CS + 3% AC 2	19,6
0,75% CS + 3% AC 3	19,2

Día 120

Tratamiento	°Brix
Blanco 1	22,8
Blanco 2	22,0
Blanco 3	22,0
3% AC 1	20,8
3% AC 2	20,8
3% AC 3	20,4
0,75% CS 1	20,8
0,75% CS 2	20,8
0,75% CS 3	20,8
0,75% CS + 3% AC 1	20,8
0,75% CS + 3% AC 2	20,6
0,75% CS + 3% AC 3	20,6

Anexo 19. Análisis del *p*H de la pulpa de chirimoya.

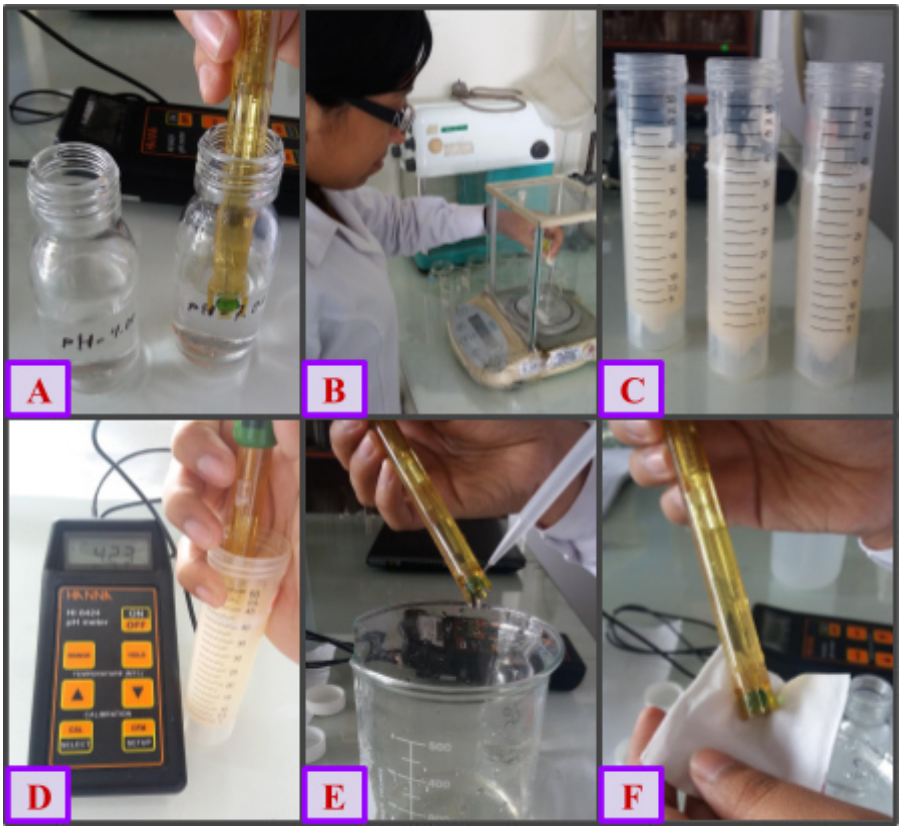


Figura 60. Proceso para obtener los valores de *p*H en cada pulpa de chirimoya tratada.

A) Estandarización del phmetro con buffer 7,01 y 4,01.
B) Pesado de la pulpa de chirimoya (4 g aproximadamente).
C) Muestra de pulpa diluida en 30 ml de agua destilada.
D) Lectura del *p*H para cada pulpa de chirimoya tratada.
E) Enjuague de los electrodos del *p*hmetro.
F) Secado de los electrodos del *p*hmetro.

Anexo 20. Resultados del *p*H en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 44

Resultados del pH en la selección de la variedad y en la evaluación de la actividad sinérgica

Variedad	**Repeticiones**	***p*H**
Lisa	R1	4,55
	R2	4,59
	R3	4,55
	R4	4,53
	Promedio	4,56
Impresa	R1	4,65
	R2	4,71
	R3	4,75
	R4	4,68
	Promedio	**4,70**
Umbonata	R1	4,5
	R2	4,53
	R3	4,56
	R4	4,5
	Promedio	**4,52**

.

Día 0

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,58
Blanco 2	4,54
Blanco 3	4,52
3% AC 1	4,24
3% AC 2	4,23
3% AC 3	4,19
0,75% CS 1	4,54
0,75% CS 2	4,50
0,75% CS 3	4,50
0,75% CS + 3% AC 1	4,13
0,75% CS + 3% AC 2	4,12
0,75% CS + 3% AC 3	4,12

Día 20

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,59
Blanco 2	4,61
Blanco 3	4,59
3% AC 1	4,30
3% AC 2	4,30
3% AC 3	4,28
0,75% CS 1	4,61
0,75% CS 2	4,60
0,75% CS 3	4,59
0,75% CS + 3% AC 1	4,29
0,75% CS + 3% AC 2	4,30
0,75% CS + 3% AC 3	4,31

Día 40

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,62
Blanco 2	4,57
Blanco 3	4,62
3% AC 1	4,18
3% AC 2	4,18
3% AC 3	4,15
0,75% CS 1	4,57
0,75% CS 2	4,52
0,75% CS 3	4,58
0,75% CS + 3% AC 1	4,19
0,75% CS + 3% AC 2	4,16
0,75% CS + 3% AC 3	4,19

Día 60

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,59
Blanco 2	4,55
Blanco 3	4,53
3% AC 1	4,25
3% AC 2	4,20
3% AC 3	4,23
0,75% CS 1	4,56
0,75% CS 2	4,53
0,75% CS 3	4,55
0,75% CS + 3% AC 1	4,22
0,75% CS + 3% AC 2	4,19
0,75% CS + 3% AC 3	4,19

Día 80

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,57
Blanco 2	4,63
Blanco 3	4,57
3% AC 1	4,20
3% AC 2	4,18
3% AC 3	4,17
0,75% CS 1	4,53
0,75% CS 2	4,51
0,75% CS 3	4,51
0,75% CS + 3% AC 1	4,24
0,75% CS + 3% AC 2	4,25
0,75% CS + 3% AC 3	4,23

Día 100

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,43
Blanco 2	4,46
Blanco 3	4,46
3% AC 1	4,10
3% AC 2	4,14
3% AC 3	4,14
0,75% CS 1	4,46
0,75% CS 2	4,44
0,75% CS 3	4,42
0,75% CS + 3% AC 1	4,11
0,75% CS + 3% AC 2	4,08
0,75% CS + 3% AC 3	4,07

Día 120

Tratamiento	*p*H
Blanco 1	4,57
Blanco 2	4,56
Blanco 3	4,53
3% AC 1	4,26
3% AC 2	4,22
3% AC 3	4,21
0,75% CS 1	4,54
0,75% CS 2	4,51
0,75% CS 3	4,50
0,75% CS + 3% AC 1	4,08
0,75% CS + 3% AC 2	4,14
0,75% CS + 3% AC 3	4,08

Anexo 21. Determinación de la actividad de la polifenoloxidasa en la pulpa de chirimoya.

Figura 61. Preparación del buffer McIlvaine (*p*H=7,0) y la solución de pirocatecol 0,01 M.

A) Peso de ácido cítrico y adición de agua destilada.
B) Disolución completa del ácido cítrico en baño ultrasónico.
C) Solución de ácido cítrico a 0,1 M.
D) Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).
E) Disolución completa del fosfato de sodio dibásico en baño ultrasonido.
F) Solución de Na_2HPO_4 al 0,2 M.
G) Disolución completa del pirocatecol en baño ultrasónico.
H) Trasvase de la solución a la fiola de 100 ml y se enrasar con agua destilada.
I) Solución de pirocatecol a 0,01 M.

- **Cálculo de la preparación de una solución (22 ml) de buffer McIlvaine (*p*H =7,0).**

- ***Solución de fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 a 0,2 M.***

Teniendo en cuenta la masa molar del fosfato disódico, empleamos la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\eta_{\text{fosfato disódico}}}{\text{Volumen}}$$

$$0{,}2\ M = \frac{\eta_{\text{fosfato disódico}}}{0{,}2\ L}$$

$$\eta_{\text{fosfato disódico}} = 0{,}04 \text{ moles}$$

$$\eta_{\text{fosfato disódico}} = \frac{\text{masa}}{\text{P.F.}}$$

$$0{,}04 \text{ moles} = \frac{\text{masa}}{141{,}96\ g/mol}$$

$$\text{masa} = 5{,}6784 \text{ g de fosfato disódico}$$

Para preparar 200 ml de solución de fosfato disódico al 0,2 M se pesó 5,6784 g de fosfato y se añadió 200 ml de agua destilada medido con una probeta de 100 ml.

- ***Solución de ácido cítrico a 0,1 M.***

De igual manera, conociendo el peso fórmula del ácido cítrico lo reemplazamos en la siguiente ecuación:

$$M = \frac{\eta_{\text{ácido cítrico}}}{\text{Volumen}}$$

$$0{,}1\ M = \frac{\eta_{\text{ácido cítrico}}}{0{,}05\ L}$$

$$\eta_{\text{ácido cítrico}} = 0{,}005 \text{ moles}$$

$$\eta_{\text{ácido cítrico}} = \frac{\text{masa}}{\text{P.F.}}$$

$$0{,}005 \text{ moles} = \frac{\text{masa}}{192{,}124 \text{ g/mol}}$$

$$\text{masa} = 0{,}9606 \text{ g de ácido cítrico}$$

Para preparar 50 ml de una solución de ácido cítrico al 0,1 M, se pesó 0,9606 g del ácido y se mezcló con 50 ml de agua destilada medido con una probeta.

- ***Preparación del buffer McIlvaine.***

En un beaker de 300 ml completamente limpio y seco se añadió 181,17 ml de la solución fosfato disódico a 0,2 M junto con 38,83 ml de la solución de ácido cítrico al 0,1 M. Finalmente se agitó con ayuda de una bagueta limpia hasta su completa homogeneización.

- **Cálculo de la preparación de una solución (50 ml) de pirocatecol al 0,01 M.**

$$M = \frac{\eta_{\text{pirocatecol}}}{\text{Volumen}}$$

$$0{,}01 \text{ M} = \frac{\eta_{\text{pirocatecol}}}{0{,}05 \text{ L}}$$

$$\eta_{\text{pirocatecol}} = 0{,}0005 \text{ moles}$$

$$\eta_{\text{pirocatecol}} = \frac{\text{masa}}{\text{P.F.}}$$

$$0{,}0005 \text{ moles} = \frac{\text{masa}}{110{,}1 \text{ g/mol}}$$

$$\text{masa} = 0{,}0551 \text{ g de pirocatecol}$$

Para preparar una solución de pirocatecol al 0,01 M se pesó 0,0551 g de pirocatecol y se disolvió en 50 ml de agua destilada utilizando una probeta de 50 ml para medir su volumen.

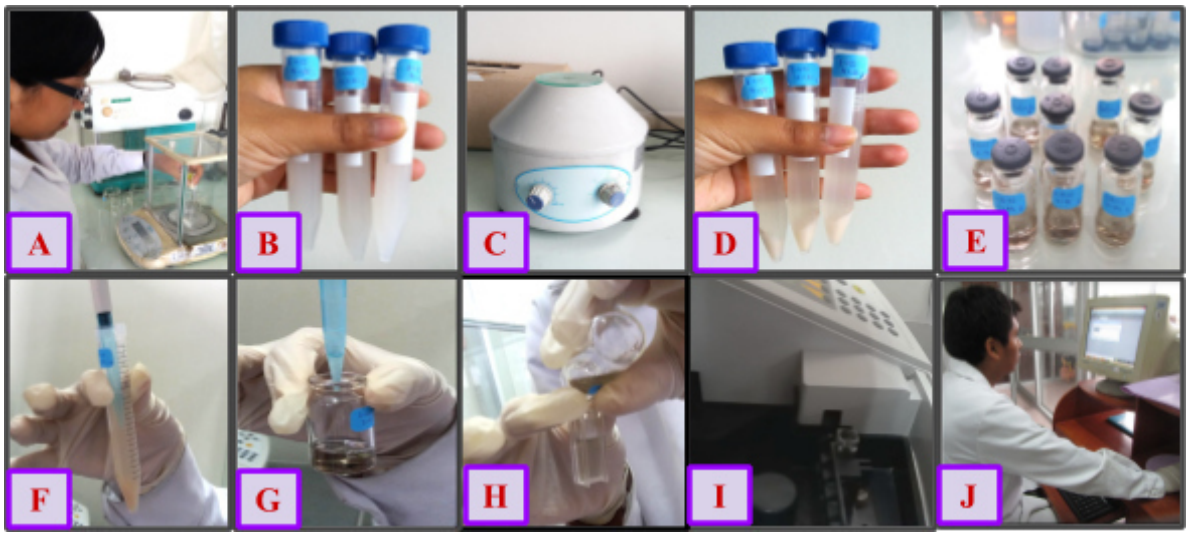


Figura 62. Procedimiento en la determinación de la actividad de la polifenoloxidasa.

A) Peso de la pulpa de chirimoya (aproximadamente 2,5 g).
B) Adición de 10 ml de buffer McIlvaine a la muestra de chirimoya.
C) Centrifugar a 2000 rpm durante 10 min.
D) Extracción de la enzima polifenoloxidasa (líquido sobrenadante).
E) Viales rotulados con 2,5 ml de solución de pirocatecol a 0,01 M.
F) Coger 100 µL del extracto enzimático.
G) Adición del extracto enzimático a la solución de pirocatecol.
H) Adición de la mezcla homogénea a la celda espectrofotométrica.
I) Colocar la celda en el espectrofotómetro.
J) Lectura de la actividad de la polifenoloxidasa.

Anexo 22. Resultados de la actividad de la PPO en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 45

Resultados de la actividad de la PPO en la evaluación de la actividad sinérgica

Día 0 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 1	0,50466523	0,06946159	0,0504	0,30254384	302,54384	2,9685	101,9180866
Muestra002	0,57412682	0,06373202					
Muestra003	0,63785884	0,05951806					
Muestra004	0,69737690	0,05037462					
Muestra005	0,74775152	0,04956404					
Muestra006	0,79731556	0,05086735					
Muestra007	0,84818291	0,03977878					
Muestra008	0,88796169	0,03779619					
Muestra009	0,92575788	0,03272311					
Muestra010	0,95848099						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
Blanco 2	0,55749985	0,07004661	0,0516	0,3098297	309,8297	2,9342	105,5925636
Muestra002	0,62754646	0,06600707					
Muestra003	0,69355353	0,05944593					
Muestra004	0,75299946	0,05263052					
Muestra005	0,80562998	0,05661409					
Muestra006	0,86224407	0,05213717					
Muestra007	0,91438124	0,04374073					
Muestra008	0,95812197	0,03458270					
Muestra009	0,99270467	0,02953973					
Muestra010	1,02224440						

Día 0 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
3%AC	0,60493059	0,07617586	0,0504	0,3024548133	302,4548133	3,0737	98,40088926
Muestra002	0,68110645	0,06308815					
Muestra003	0,74419460	0,05954629					
Muestra004	0,80374089	0,05366944					
Muestra005	0,85741033	0,05233162					
Muestra006	0,90974195	0,04421576					
Muestra007	0,95395771	0,03919133					
Muestra008	0,99314904	0,03596504					
Muestra009	1,02911408	0,02949873					
Muestra010	1,05861281						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
3%AC	0,42489417	0,05611048	0,0442	0,26533108	265,33108	3,0319	87,51313698
Muestra002	0,48100465	0,05022722					
Muestra003	0,53123187	0,04633917					
Muestra004	0,57757104	0,04228106					
Muestra005	0,61985210	0,04579871					
Muestra006	0,66565081	0,04608207					
Muestra007	0,71173288	0,03964168					
Muestra008	0,75137456	0,03799396					
Muestra009	0,78936852	0,03352227					
Muestra010	0,82289079						

Día 0 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 - 1	0,42595831	0,05502531	0,0415	0,2487394333	248,7394333	2,6779	92,8860052
Muestra002	0,48098362	0,04615612					
Muestra003	0,52713974	0,04368473					
Muestra004	0,57082447	0,04286923					
Muestra005	0,61369370	0,04322675					
Muestra006	0,65692045	0,03749605					
Muestra007	0,69441650	0,03625038					
Muestra008	0,73066688	0,03458306					
Muestra009	0,76524994	0,03381752					
Muestra010	0,79906746						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 - 2	0,48190213	0,04748454	0,0392	0,23527726	235,27726	2,5678	91,6260067
Muestra002	0,52938667	0,04864271					
Muestra003	0,57802938	0,04220114					
Muestra004	0,62023052	0,04152022					
Muestra005	0,66175074	0,03761683					
Muestra006	0,69936757	0,03740600					
Muestra007	0,73677357	0,03420023					
Muestra008	0,77097380	0,03117798					
Muestra009	0,80215178	0,03266624					
Muestra010	0,83481802						

Día 0 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,36658811	0,05032539	0,0383	0,2295781733	229,5781733	2,9555	77,67828568
Muestra002	0,41691350	0,04494023					
Muestra003	0,46185373	0,04019433					
Muestra004	0,50204806	0,04302328					
Muestra005	0,54507134	0,03571664					
Muestra006	0,58078798	0,03290037					
Muestra007	0,61368835	0,03262233					
Muestra008	0,64631068	0,03332490					
Muestra009	0,67963558	0,03131979					
Muestra010	0,71095537						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 2	0,39468094	0,04256478	0,0358	0,21469514	214,69514	3,036	70,71644928
Muestra002	0,43724572	0,03948528					
Muestra003	0,47673100	0,04052401					
Muestra004	0,51725501	0,03597334					
Muestra005	0,55322835	0,03615636					
Muestra006	0,58938471	0,03348578					
Muestra007	0,62287049	0,03306947					
Muestra008	0,65593996	0,03005581					
Muestra009	0,68599577	0,03072788					
Muestra010	0,71672365						

Día 20 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 1	0,37578393	0,06371285	0,0503	0,3016305	301,6305	2,6468	113,9604428
Muestra002	0,43949678	0,05760246					
Muestra003	0,49709924	0,05291200					
Muestra004	0,55001124	0,04979109					
Muestra005	0,59980233	0,04980620					
Muestra006	0,64960853	0,04945486					
Muestra007	0,69906339	0,04849380					
Muestra008	0,74755719	0,04283934					
Muestra009	0,79039653	0,03783315					
Muestra010	0,82822968						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
Blanco 2	0,42982730	0,05052975	0,0463	0,2777975067	277,7975067	2,582	107,5900491
Muestra002	0,48035705	0,05535912					
Muestra003	0,53571617	0,04881800					
Muestra004	0,58453417	0,05159636					
Muestra005	0,63613053	0,04141448					
Muestra006	0,67754501	0,04103979					
Muestra007	0,71858480	0,04156788					
Muestra008	0,76015268	0,04378173					
Muestra009	0,80393441	0,04258915					
Muestra010	0,84652356						

Día 20 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
3 AC	0,33909185	0,04009878	0,0364	0,2185196067	218,5196067	2,481	88,07722961
Muestra002	0,37919063	0,04208308					
Muestra003	0,42127371	0,03398375					
Muestra004	0,45525746	0,03847028					
Muestra005	0,49372774	0,03545472					
Muestra006	0,52918246	0,03623906					
Muestra007	0,56542152	0,03577248					
Muestra008	0,60119400	0,03354645					
Muestra009	0,63474045	0,03213081					
Muestra010	0,66687126						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
3- 2 AC	0,34078475	0,03781668	0,0390	0,2339066867	233,9066867	2,4633	94,95663811
Muestra002	0,37860143	0,03959905					
Muestra003	0,41820048	0,03759128					
Muestra004	0,45579176	0,04252060					
Muestra005	0,49831236	0,03393751					
Muestra006	0,53224987	0,04056274					
Muestra007	0,57281261	0,04631074					
Muestra008	0,61912335	0,03625844					
Muestra009	0,65538179	0,03626299					
Muestra010	0,69164478						

Día 20 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0.75 - 1	0,42823412	0,05051924	0,0434	0,26055074	260,55074	2,5976	100,3044118
Muestra002	0,47875336	0,04926149					
Muestra003	0,52801485	0,04804660					
Muestra004	0,57606145	0,04847247					
Muestra005	0,62453392	0,04277318					
Muestra006	0,66730710	0,03921543					
Muestra007	0,70652253	0,04331861					
Muestra008	0,74984114	0,03501852					
Muestra009	0,78485966	0,03420057					
Muestra010	0,81906023						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 - 2	0,50891158	0,06051676	0,0455	0,27293996	272,93996	2,6632	102,4857164
Muestra002	0,56942834	0,05414071					
Muestra003	0,62356905	0,04782712					
Muestra004	0,67139617	0,04640104					
Muestra005	0,71779721	0,04401111					
Muestra006	0,76180832	0,04183032					
Muestra007	0,80363864	0,04348009					
Muestra008	0,84711873	0,03577577					
Muestra009	0,88289450	0,03542702					
Muestra010	0,91832152						

Día 20 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,31868005	0,03864674	0,0326	0,1956225467	195,6225467	2,4758	79,01387296
Muestra002	0,35732679	0,03431515					
Muestra003	0,39164194	0,03771940					
Muestra004	0,42936134	0,03250371					
Muestra005	0,46186505	0,03182072					
Muestra006	0,49368577	0,03126806					
Muestra007	0,52495383	0,03011183					
Muestra008	0,55506566	0,02908660					
Muestra009	0,58415226	0,02796161					
Muestra010	0,61211387						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 + 3 - 2	0,42118550	0,03640988	0,0340	0,2039001933	203,9001933	2,5369	80,37376063
Muestra002	0,45759538	0,03711488					
Muestra003	0,49471026	0,03583298					
Muestra004	0,53054324	0,03561975					
Muestra005	0,56616299	0,03492700					
Muestra006	0,60108999	0,03359990					
Muestra007	0,63468989	0,03137944					
Muestra008	0,66606933	0,03098100					
Muestra009	0,69705033	0,02998546					
Muestra010	0,72703579						

Día 40 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 1	0,38609267	0,06334513	0,0496	0,2975494533	297,5494533	2,6159	113,7464939
Muestra002	0,44943780	0,05746121					
Muestra003	0,50689901	0,05620242					
Muestra004	0,56310143	0,05091714					
Muestra005	0,61401857	0,04608102					
Muestra006	0,66009959	0,04564367					
Muestra007	0,70574326	0,04796748					
Muestra008	0,75371074	0,04313938					
Muestra009	0,79685012	0,03556673					
Muestra010	0,83241685						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
Blanco 2	0,35831672	0,05395885	0,0442	0,2653336467	265,3336467	2,5775	102,9422489
Muestra002	0,41227557	0,05268488					
Muestra003	0,46496045	0,04840933					
Muestra004	0,51336978	0,04727858					
Muestra005	0,56064836	0,04099317					
Muestra006	0,60164153	0,03966237					
Muestra007	0,64130390	0,03733383					
Muestra008	0,67863773	0,03653690					
Muestra009	0,71517463	0,04114256					
Muestra010	0,75631719						

Día 40 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
3 - AC	0,34375322	0,04335066	0,0371	0,22256782	222,56782	2,5299	87,97494763
Muestra002	0,38710388	0,04117332					
Muestra003	0,42827720	0,03931498					
Muestra004	0,46759218	0,03857628					
Muestra005	0,50616846	0,03667508					
Muestra006	0,54284354	0,03457647					
Muestra007	0,57742001	0,03446813					
Muestra008	0,61188814	0,03331601					
Muestra009	0,64520415	0,03240080					
Muestra010	0,67760495						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
3 - AC 2	0,31126970	0,04621434	0,0372	0,2234453	223,4453	2,6094	85,63091132
Muestra002	0,35748404	0,04208872					
Muestra003	0,39957276	0,04114918					
Muestra004	0,44072194	0,03677905					
Muestra005	0,47750099	0,03561818					
Muestra006	0,51311917	0,03373991					
Muestra007	0,54685908	0,03440058					
Muestra008	0,58125966	0,03323416					
Muestra009	0,61449382	0,03194383					
Muestra010	0,64643765						

Día 40 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 CS -1	0,38862087	0,05293338	0,0417	0,25035174	250,35174	2,6514	94,42247115
Muestra002	0,44155425	0,05092449					
Muestra003	0,49247874	0,04415542					
Muestra004	0,53663416	0,04373056					
Muestra005	0,58036472	0,03912556					
Muestra006	0,61949028	0,03823512					
Muestra007	0,65772540	0,03777761					
Muestra008	0,69550301	0,03245338					
Muestra009	0,72795639	0,03619209					
Muestra010	0,76414848						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 - CS 2	0,40194963	0,05900314	0,0443	0,2659782933	265,9782933	2,566	103,6548298
Muestra002	0,46095277	0,05190037					
Muestra003	0,51285314	0,05067888					
Muestra004	0,56353202	0,04681647					
Muestra005	0,61034849	0,04606569					
Muestra006	0,65641418	0,04030983					
Muestra007	0,69672401	0,03478460					
Muestra008	0,73150861	0,03919360					
Muestra009	0,77070221	0,03021486					
Muestra010	0,80091707						

Día 40 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,31416246	0,04009802	0,0323	0,1940331733	194,0331733	2,5685	75,5433807
Muestra002	0,35426048	0,03658817					
Muestra003	0,39084865	0,03616945					
Muestra004	0,42701810	0,03304309					
Muestra005	0,46006119	0,03056959					
Muestra006	0,49063078	0,02877164					
Muestra007	0,51940242	0,02973596					
Muestra008	0,54913838	0,02754528					
Muestra009	0,57668366	0,02852856					
Muestra010	0,60521222						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 + 3 - 2	0,30684663	0,04387012	0,0350	0,210083	210,083	2,617	80,27627054
Muestra002	0,35071675	0,04297499					
Muestra003	0,39369174	0,03629684					
Muestra004	0,42998858	0,03592056					
Muestra005	0,46590914	0,03344417					
Muestra006	0,49935331	0,03176642					
Muestra007	0,53111973	0,03040754					
Muestra008	0,56152727	0,03135388					
Muestra009	0,59288115	0,02908998					
Muestra010	0,62197113						

Día 60 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 1	0,34778848	0,05996368	0,0485	0,2910387333	291,0387333	2,5898	112,3788452
Muestra002	0,40775216	0,05685877					
Muestra003	0,46461093	0,05545116					
Muestra004	0,52006209	0,04719624					
Muestra005	0,56725833	0,04749835					
Muestra006	0,61475668	0,04560508					
Muestra007	0,66036176	0,04093796					
Muestra008	0,70129972	0,04291416					
Muestra009	0,74421388	0,04013270					
Muestra010	0,78434658						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 2	0,41806285	0,05181561	0,0456	0,2735927533	273,5927533	2,6536	103,1024847
Muestra002	0,46987846	0,04893842					
Muestra003	0,51881688	0,05101128					
Muestra004	0,56982816	0,04516470					
Muestra005	0,61499286	0,04492013					
Muestra006	0,65991299	0,04015717					
Muestra007	0,70007016	0,04328905					
Muestra008	0,74335921	0,04025582					
Muestra009	0,78361503	0,04483695					
Muestra010	0,82845198						

Día 60 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
3 AC - 1	0,33348857	0,04648058	0,0354	0,2124013933	212,4013933	2,4467	86,81137587
Muestra002	0,37996915	0,03819493					
Muestra003	0,41816408	0,03698313					
Muestra004	0,45514721	0,03440698					
Muestra005	0,48955419	0,03356059					
Muestra006	0,52311478	0,03198985					
Muestra007	0,55510463	0,03240794					
Muestra008	0,58751257	0,03308944					
Muestra009	0,62060201	0,03148865					
Muestra010	0,65209066						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
3 AC - 2	0,36942874	0,03538158	0,0326	0,1953654067	195,3654067	2,3792	82,11390664
Muestra002	0,40481032	0,03282543					
Muestra003	0,43763575	0,03380618					
Muestra004	0,47144193	0,03137677					
Muestra005	0,50281870	0,03279907					
Muestra006	0,53561777	0,03150109					
Muestra007	0,56711886	0,03901650					
Muestra008	0,60613536	0,02827932					
Muestra009	0,63441468	0,02806217					
Muestra010	0,66247685						

Día 60 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 - 1	0,38509013	0,04566006	0,0372	0,2231442267	223,1442267	2,5634	87,05010013
Muestra002	0,43075019	0,03797915					
Muestra003	0,46872934	0,04021448					
Muestra004	0,50894382	0,03949693					
Muestra005	0,54844075	0,03740683					
Muestra006	0,58584758	0,03584175					
Muestra007	0,62168933	0,03482724					
Muestra008	0,65651657	0,03243773					
Muestra009	0,68895430	0,03085217					
Muestra010	0,71980647						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 -2	0,39467125	0,04073606	0,0347	0,20822216	208,22216	2,5059	83,09276507
Muestra002	0,43540731	0,03954788					
Muestra003	0,47495519	0,03462979					
Muestra004	0,50958498	0,03465986					
Muestra005	0,54424484	0,03302911					
Muestra006	0,57727395	0,03493238					
Muestra007	0,61220633	0,03269862					
Muestra008	0,64490495	0,03232187					
Muestra009	0,67722682	0,02977767					
Muestra010	0,70700449						

Día 60 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,44564169	0,04093560	0,0327	0,1964093067	196,4093067	2,6455	74,24279216
Muestra002	0,48657729	0,03763679					
Muestra003	0,52421408	0,03300523					
Muestra004	0,55721931	0,03316199					
Muestra005	0,59038130	0,03178266					
Muestra006	0,62216396	0,02994814					
Muestra007	0,65211210	0,02953444					
Muestra008	0,68164654	0,03066592					
Muestra009	0,71231246	0,02794319					
Muestra010	0,74025565						
Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 2	0,38216963	0,03999288	0,0320	0,1917558667	191,7558667	2,5588	74,93976343
Muestra002	0,42216251	0,03498842					
Muestra003	0,45715093	0,03496218					
Muestra004	0,49211311	0,03696361					
Muestra005	0,52907672	0,03134271					
Muestra006	0,56041943	0,02979787					
Muestra007	0,59021730	0,02718938					
Muestra008	0,61740668	0,02690432					
Muestra009	0,64431100	0,02549243					
Muestra010	0,66980343						

Día 80 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
Blanco 1	0,29542398	0,05012705	0,0402	0,2410015933	241,0015933	2,5222	95,55213438
Muestra002	0,34555103	0,04774953					
Muestra003	0,39330056	0,04742018					
Muestra004	0,44072074	0,04171654					
Muestra005	0,48243728	0,03461914					
Muestra006	0,51705642	0,03722576					
Muestra007	0,55428218	0,03433553					
Muestra008	0,58861771	0,03277729					
Muestra009	0,62139500	0,03553137					
Muestra010	0,65692637						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
Blanco 2	0,35447163	0,04984811	0,0396	0,23762904	237,62904	2,9672	80,08527905
Muestra002	0,40431974	0,04415829					
Muestra003	0,44847803	0,04171347					
Muestra004	0,49019150	0,04303131					
Muestra005	0,53322281	0,03451360					
Muestra006	0,56773641	0,03570858					
Muestra007	0,60344499	0,03790835					
Muestra008	0,64135334	0,03746678					
Muestra009	0,67882012	0,03209507					
Muestra010	0,71091519						

Día 80 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
AC - 3- 1	0,38911104	0,03774920	0,0354	0,2125914933	212,5914933	2,5269	84,13134407
Muestra002	0,42686024	0,03718141					
Muestra003	0,46404165	0,03858910					
Muestra004	0,50263075	0,03320174					
Muestra005	0,53583249	0,03016579					
Muestra006	0,56599828	0,03500000					
Muestra007	0,60099828	0,03600000					
Muestra008	0,63699828	0,03600000					
Muestra009	0,67299828	0,03500000					
Muestra010	0,70799828						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
3 AC - 2	0,26291236	0,04728970	0,0388	0,2327595267	232,7595267	2,863	81,29917103
Muestra002	0,31020206	0,04912673					
Muestra003	0,35932879	0,03983875					
Muestra004	0,39916754	0,04163109					
Muestra005	0,44079863	0,03578530					
Muestra006	0,47658393	0,03689917					
Muestra007	0,51348310	0,03233542					
Muestra008	0,54581852	0,03378506					
Muestra009	0,57960358	0,03244807					
Muestra010	0,61205165						

Día 80 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
CS - 1	0,25800979	0,04625206	0,0385	0,2309985467	230,9985467	2,9705	77,76419682
Muestra002	0,30426185	0,04208192					
Muestra003	0,34634377	0,04500399					
Muestra004	0,39134776	0,03903842					
Muestra005	0,43038618	0,03890710					
Muestra006	0,46929328	0,03628773					
Muestra007	0,50558101	0,03613023					
Muestra008	0,54171124	0,03126381					
Muestra009	0,57297505	0,03153256					
Muestra010	0,60450761						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
CS - 2	0,25964442	0,05842545	0,0435	0,2612295533	261,2295533	3,1026	84,19698103
Muestra002	0,31806987	0,05739537					
Muestra003	0,37546524	0,07318359					
Muestra004	0,44864883	0,03513056					
Muestra005	0,48377939	0,03405762					
Muestra006	0,51783701	0,03493051					
Muestra007	0,55276752	0,03181004					
Muestra008	0,58457756	0,03855909					
Muestra009	0,62313665	0,02835210					
Muestra010	0,65148875						

Día 80 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,14111226	0,03007001	0,0249	0,1494854133	149,4854133	2,5336	59,00118935
Muestra002	0,17118227	0,02869271					
Muestra003	0,19987498	0,02680456					
Muestra004	0,22667954	0,02683183					
Muestra005	0,25351137	0,02592583					
Muestra006	0,27943720	0,02266683					
Muestra007	0,30210403	0,02176777					
Muestra008	0,32387180	0,02150988					
Muestra009	0,34538168	0,01995870					
Muestra010	0,36534038						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 + 3 - 2	0,38669319	0,02971248	0,0264	0,15858732	158,58732	2,9227	54,2605536
Muestra002	0,41640567	0,02749093					
Muestra003	0,44389660	0,02661016					
Muestra004	0,47050676	0,02552289					
Muestra005	0,49602965	0,02549188					
Muestra006	0,52152153	0,02650178					
Muestra007	0,54802331	0,02230676					
Muestra008	0,57033007	0,03135485					
Muestra009	0,60168492	0,02288925					
Muestra010	0,62457417						

Día 100 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
BLANCO 1	0,29428507	0,04386440	0,0375	0,2247450333	224,7450333	2,6415	85,0823522
Muestra002	0,33814947	0,04428828					
Muestra003	0,38243775	0,04112645					
Muestra004	0,42356420	0,03803929					
Muestra005	0,46160349	0,03652832					
Muestra006	0,49813181	0,03489090					
Muestra007	0,53302271	0,03659904					
Muestra008	0,56962175	0,03049522					
Muestra009	0,60011697	0,03128565					
Muestra010	0,63140262						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
BLANCO 2	0,39098860	0,04809857	0,0371	0,2228832467	222,8832467	2,702	82,48824821
Muestra002	0,43908717	0,04304423					
Muestra003	0,48213140	0,04032484					
Muestra004	0,52245624	0,03841168					
Muestra005	0,56086792	0,03632924					
Muestra006	0,59719716	0,03252482					
Muestra007	0,62972198	0,03121434					
Muestra008	0,66093632	0,03463348					
Muestra009	0,69556980	0,02974367					
Muestra010	0,72531347						

Día 100 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
AC - 1	0,30445353	0,04364267	0,0350	0,2097160467	209,7160467	2,6472	79,22183691
Muestra002	0,34809620	0,04250471					
Muestra003	0,39060091	0,03663201					
Muestra004	0,42723292	0,03450133					
Muestra005	0,46173425	0,03578810					
Muestra006	0,49752235	0,03664438					
Muestra007	0,53416673	0,03028671					
Muestra008	0,56445344	0,02884802					
Muestra009	0,59330146	0,02572614					
Muestra010	0,61902760						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
AC - 2	0,29804020	0,04172631	0,0328	0,1969748	196,9748	2,5545	77,108945
Muestra002	0,33976651	0,03743941					
Muestra003	0,37720592	0,03678096					
Muestra004	0,41398688	0,03223565					
Muestra005	0,44622253	0,03390880					
Muestra006	0,48013133	0,03271615					
Muestra007	0,51284748	0,02886376					
Muestra008	0,54171124	0,02690248					
Muestra009	0,56861372	0,02488868					
Muestra010	0,59350240						

Día 100 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
CS - 1	0,35865778	0,03967110	0,0338	0,20258598	202,58598	2,6745	75,747235
Muestra002	0,39832888	0,04030495					
Muestra003	0,43863383	0,03656905					
Muestra004	0,47520288	0,03201858					
Muestra005	0,50722146	0,03150067					
Muestra006	0,53872213	0,03362301					
Muestra007	0,57234514	0,03304035					
Muestra008	0,60538549	0,02990033					
Muestra009	0,63528582	0,02725093					
Muestra010	0,66253675						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
CS - 2	0,34113708	0,04460602	0,0328	0,1965107667	196,5107667	2,6369	74,52340501
Muestra002	0,38574310	0,03949316					
Muestra003	0,42523626	0,03696982					
Muestra004	0,46220608	0,03260730					
Muestra005	0,49481338	0,02983800					
Muestra006	0,52465138	0,02889068					
Muestra007	0,55354206	0,02873886					
Muestra008	0,58228092	0,02595854					
Muestra009	0,60823946	0,02766377					
Muestra010	0,63590323						

Día 100 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,23736569	0,04253705	0,0300	0,18007984	180,07984	2,6885	66,98152873
Muestra002	0,27990274	0,03465739					
Muestra003	0,31456013	0,03179521					
Muestra004	0,34635534	0,03163280					
Muestra005	0,37798814	0,02777958					
Muestra006	0,40576772	0,02826410					
Muestra007	0,43403182	0,02491465					
Muestra008	0,45894647	0,02355413					
Muestra009	0,48250060	0,02498485					
Muestra010	0,50748545						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 + 3 - 2	0,29008840	0,03580125	0,0265	0,15882572	158,82572	2,5405	62,51750443
Muestra002	0,32588965	0,03348483					
Muestra003	0,35937448	0,02851163					
Muestra004	0,38788611	0,02733955					
Muestra005	0,41522566	0,02443125					
Muestra006	0,43965691	0,02357513					
Muestra007	0,46323204	0,02188698					
Muestra008	0,48511902	0,02186512					
Muestra009	0,50698414	0,02134284					
Muestra010	0,52832698						

Día 120 - Blanco

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
blanco 1	0,33385564	0,05576956	0,0442	0,2651644	265,1644	2,5873	102,4869169
Muestra002	0,38962520	0,04989070					
Muestra003	0,43951590	0,04842572					
Muestra004	0,48794162	0,04529601					
Muestra005	0,53323763	0,04262588					
Muestra006	0,57586351	0,04291669					
Muestra007	0,61878020	0,03837882					
Muestra008	0,65715902	0,03940515					
Muestra009	0,69656417	0,03503807					
Muestra010	0,73160224						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
blanco 2	0,31133462	0,05655141	0,0461	0,2768531867	276,8531867	2,7238	101,6422596
Muestra002	0,36788603	0,05119469					
Muestra003	0,41908072	0,04749932					
Muestra004	0,46658004	0,05021364					
Muestra005	0,51679368	0,04350582					
Muestra006	0,56029950	0,04535565					
Muestra007	0,60565515	0,04543862					
Muestra008	0,65109377	0,04313152					
Muestra009	0,69422529	0,03238911					
Muestra010	0,72661440						

Día 120 - 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
AC - 1	0,29855550	0,04373578	0,0367	0,22012668	220,12668	2,5712	85,61242999
Muestra002	0,34229128	0,03814898					
Muestra003	0,38044026	0,03852307					
Muestra004	0,41896333	0,03806692					
Muestra005	0,45703025	0,03480782					
Muestra006	0,49183807	0,03343152					
Muestra007	0,52526959	0,03487530					
Muestra008	0,56014489	0,03375626					
Muestra009	0,59390115	0,03484437					
Muestra010	0,62874552						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
AC - 2	0,30750736	0,04853391	0,0402	0,24145086	241,45086	2,661	90,73688839
Muestra002	0,35604127	0,04925135					
Muestra003	0,40529262	0,03873072					
Muestra004	0,44402334	0,04340165					
Muestra005	0,48742499	0,03969575					
Muestra006	0,52712074	0,03708743					
Muestra007	0,56420817	0,03581888					
Muestra008	0,60002705	0,03525127					
Muestra009	0,63527832	0,03440533					
Muestra010	0,66968365						

Día 120 - 0,75% CS

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
CS - 1	0,32139605	0,04461869	0,0385	0,23093594	230,93594	2,5001	92,37068117
Muestra002	0,36601474	0,04535058					
Muestra003	0,41136532	0,04090673					
Muestra004	0,45227205	0,03885228					
Muestra005	0,49112433	0,03703703					
Muestra006	0,52816136	0,03622040					
Muestra007	0,56438176	0,03587704					
Muestra008	0,60025880	0,03722857					
Muestra009	0,63748737	0,03031259					
Muestra010	0,66779996						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
CS - 2	0,31280558	0,04862929	0,0410	0,24582582	245,82582	2,7204	90,3638509
Muestra002	0,36143487	0,04819484					
Muestra003	0,40962971	0,04251685					
Muestra004	0,45214656	0,04135247					
Muestra005	0,49349903	0,04308582					
Muestra006	0,53658485	0,04037090					
Muestra007	0,57695575	0,03576479					
Muestra008	0,61272054	0,03653539					
Muestra009	0,64925593	0,03228838					
Muestra010	0,68154431						

Día 120 - 0,75% CS + 3% AC

Tratamiento	Absorbancia	Variación/10 s	Promedio de la variación	Variación / min	Unidades de PPO	Masa	Actividad de la PPO
0,75 + 3 - 1	0,26939455	0,03607132	0,0292	0,1752713933	175,2713933	2,6586	65,92619925
Muestra002	0,30546587	0,03160922					
Muestra003	0,33707509	0,03339707					
Muestra004	0,37047216	0,03359203					
Muestra005	0,40406419	0,02591387					
Muestra006	0,42997806	0,02737699					
Muestra007	0,45735505	0,02395601					
Muestra008	0,48131106	0,02472787					
Muestra009	0,50603893	0,02626271					
Muestra010	0,53230164						
Tratamiento	**Absorbancia**	**Variación/10 s**	**Promedio de la variación**	**Variación / min**	**Unidades de PPO**	**Masa**	**Actividad de la PPO**
0,75 + 3 - 2	0,28604181	0,03559644	0,0294	0,1764638867	176,4638867	2,531	69,72101409
Muestra002	0,32163825	0,03327270					
Muestra003	0,35491095	0,03004218					
Muestra004	0,38495313	0,03111393					
Muestra005	0,41606706	0,02989345					
Muestra006	0,44596051	0,02656555					
Muestra007	0,47252606	0,02634892					
Muestra008	0,49887498	0,02485292					
Muestra009	0,52372790	0,02700974					
Muestra010	0,55073764						

Anexo 23. Análisis del color en la pulpa de chirimoya

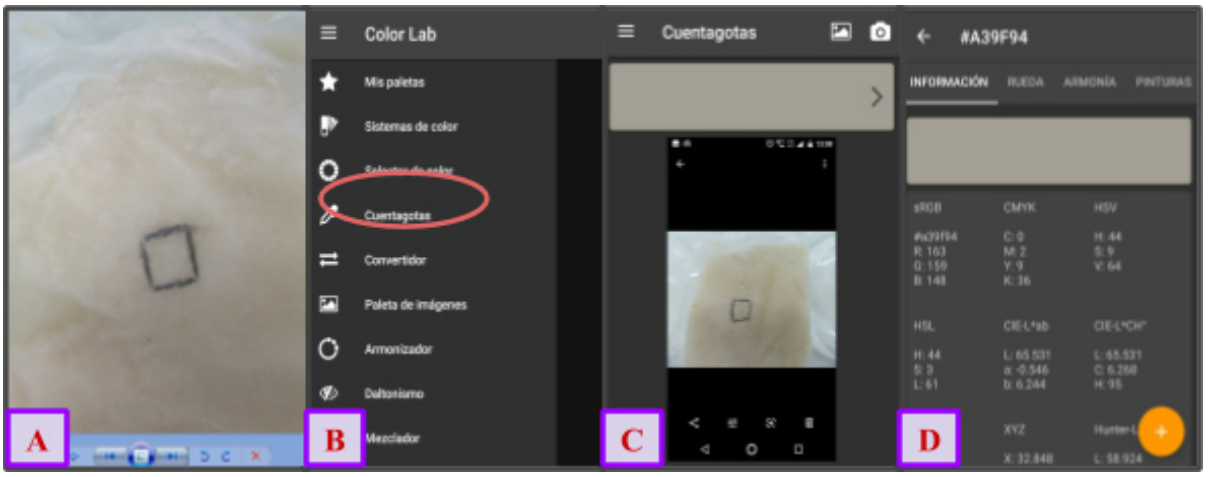


Figura 63. Procedimiento del análisis del color en la pulpa de chirimoya.

A) Foto de la pulpa de chirimoya.
B) Seleccionar la opción cuentagotas del aplicativo "Color Lab" (Dispositivo Android).
C) Indicar con el puntero la zona a evaluar.
D) Recopilación de la información detallada del color en el sistema Cie-Lab y RGB.

Anexo 24. Resultados del color en la evaluación de la actividad sinérgica.

Tabla 46

Fotos del pardeamiento enzimático producidos en la pulpa de chirimoya durante la evaluación

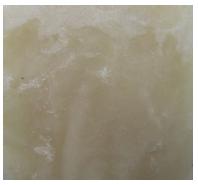
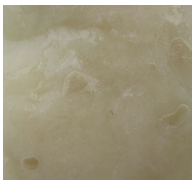
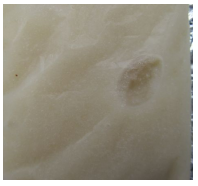
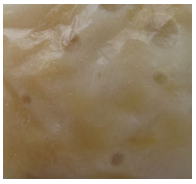
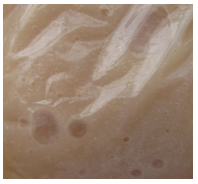
Día	Blanco	AC	CS	CS + AC
0				
20				
40				
60				
80				
100				
120				

Tabla 47

Parámetro L del sistema Cie-Lab para el análisis del color de la pulpa de chirimoya durante la evaluación*

Días	Blanco	AC	CS	CS + AC
0	68,273 68,263 68,277	71,898 71,888 71,900	65,273 65,275 65,268	74,841 74,851 74,841
20	65,938 65,942 65,933	68,925 68,931 68,943	65,937 65,938 65,945	74,161 74,151 74,141
40	60,071 60,051 60,031	68,273 68,274 68,289	59,188 59,162 59,198	77,760 77,765 77,755
60	56,622 56,600 56,653	65,273 65,292 65,265	56,622 56,612 56,646	74,389 74,380 74,308
80	61,020 61,123 61,087	62,431 62,414 62,478	53,677 53,668 53,698	71,432 71,432 71,422
100	54,885 54,862 54,877	60,051 60,043 60,055	54,104 54,111 54,121	69,114 69,100 69,122
120	54,745 54,755 54,775	56,789 56,798 56,777	50,974 50,956 50,988	66,143 66,121 66,111

Tabla 48

Parámetro a del sistema Cie-Lab para el análisis del color de la pulpa de chirimoya durante la evaluación*

Días	Blanco	AC	CS	CS + AC
0	-4,233 -4,239 -4,230	-1.204 -1,212 -1,205	-4,257 -4,267 -4,250	-1,413 -1,412 -1,425
20	-1.182 -1,173 -1,184	-1,194 -1,194 -1,187	-1,182 -1,172 -1,192	-1,413 -1,412 -1,425
40	0,138 0,139 0,128	-4,233 -4,222 -4,223	-4,306 -4,326 -4,316	-1,221 -1,278 -1,234
60	-2,332 -2,316 -2,356	-4,257 -4,259 -4,247	-2,332 -2,320 -2,342	-2,887 -2,852 -2,821
80	3,150 3,159 3,143	-2,931 -2,951 -2,921	-1,109 -1,100 -1,143	-2,857 -2,871 -2,865
100	3,443 3,478 3,456	0,138 0,111 0,125	0,016 0,022 0,008	0,094 0,086 0,090
120	2,557 2,531 2,587	-1,132 -1,144 -1,123	0,130 0,128 0,136	0,107 0,118 0,116

Tabla 49

Parámetro b del sistema Cie-Lab para el análisis del color de la pulpa de chirimoya durante la evaluación*

Días	Blanco	AC	CS	CS + AC
0	12,421 12,432 12,418	13,323 13,327 13,323	12,535 12,525 12,535	13,211 13,214 13,200
20	13,566 13,560 13,584	13,441 13,432 13,452	13,566 13,545 13,566	12,343 12,345 12,340
40	9,563 9,543 9,582	12,421 12,418 12,474	12,785 12,774 12,794	13,104 13,124 13,100
60	18,300 18,399 18,178	12,515 12,535 12,542	18,300 18,323 18,399	8,134 8,124 8,174
80	24,598 24,576 24,604	8,423 8,412 8,422	14,142 14,142 14,178	8,201 8,193 8,184
100	25,129 25,129 25,113	9,563 9,555 9,576	23,959 23,950 23,960	9,289 9,271 9,265
120	29,399 29,406 29,386	13,984 13,974 13,999	24,229 24,210 24,235	9,375 9,366 9,398

Anexo 25. Caracterización física de la chirimoya (Variedad Lisa).

- **Peso.**

Figura 64. Pesado de la chirimoya.

A) Cinco muestras de chirimoya variedad Lisa.
B) Pesado de las frutas de chirimoya.

- **Tamaño.**

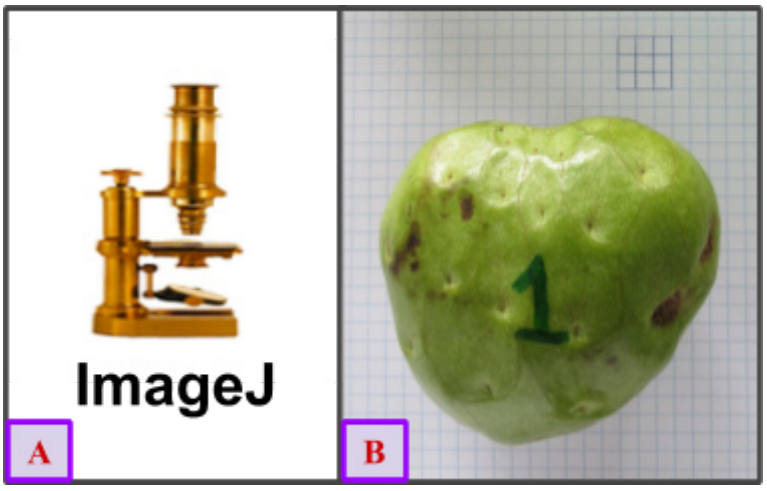


Figura 65. Obtención del diámetro y longitud en frutas de chirimoya.

A) Software utilizado para obtener el diámetro y longitud de las chirimoyas.
B) Foto de chirimoya utilizada en el software ImageJ.

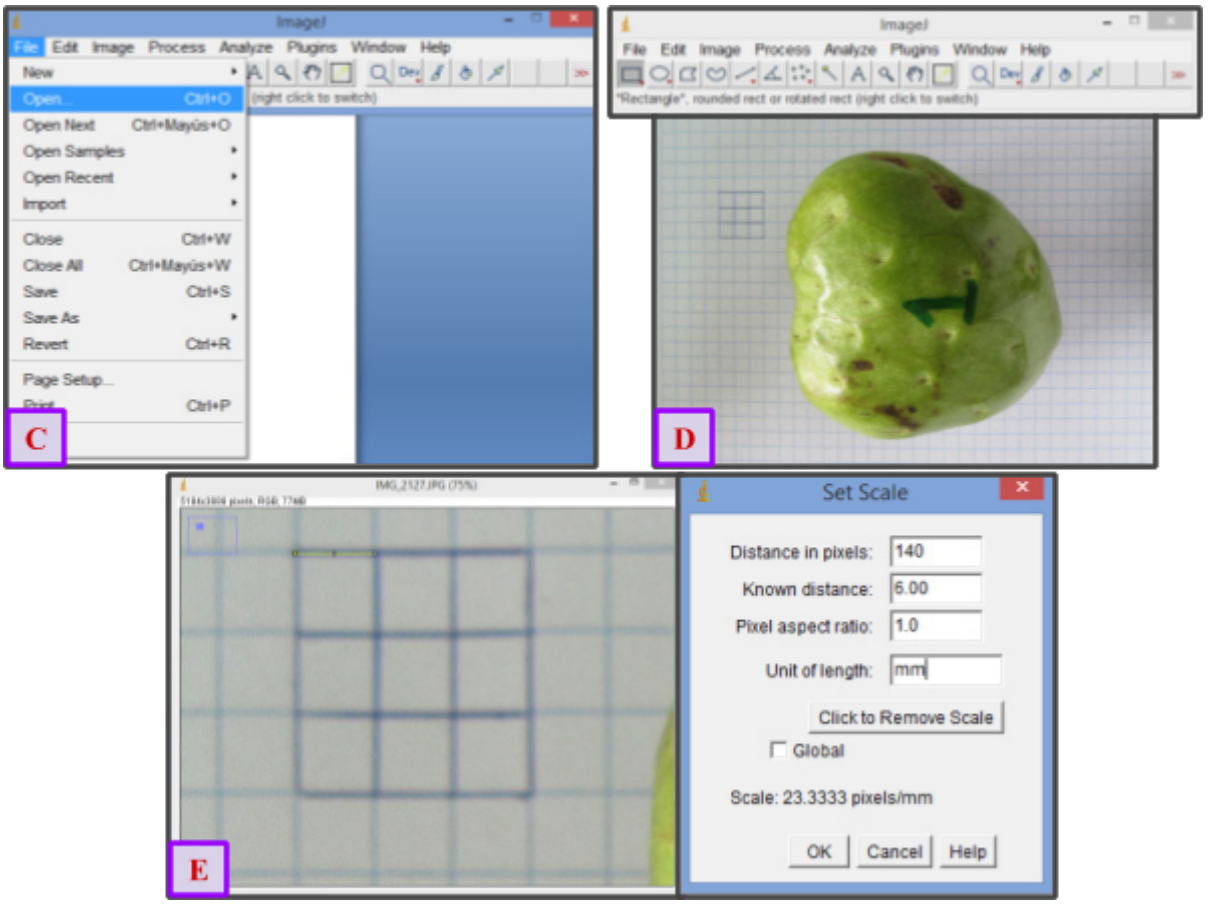


Figura 66. Aplicación del software ImageJ para obtener las dimensiones de la fruta de chirimoya.

C) Barra de herramientas del software ImageJ
D) Foto de la chirimoya que será analizada en el software ImageJ
E) Implementación de una distancia en píxeles a partir de una distancia conocida

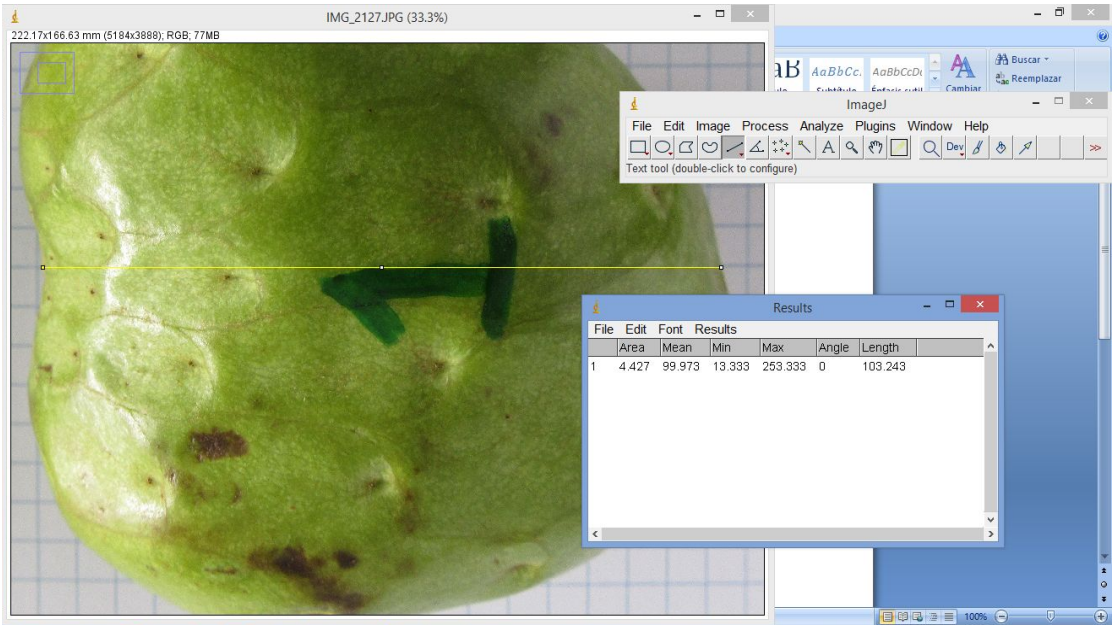


Figura 67. Obtención de la longitud en la fruta de chirimoya.

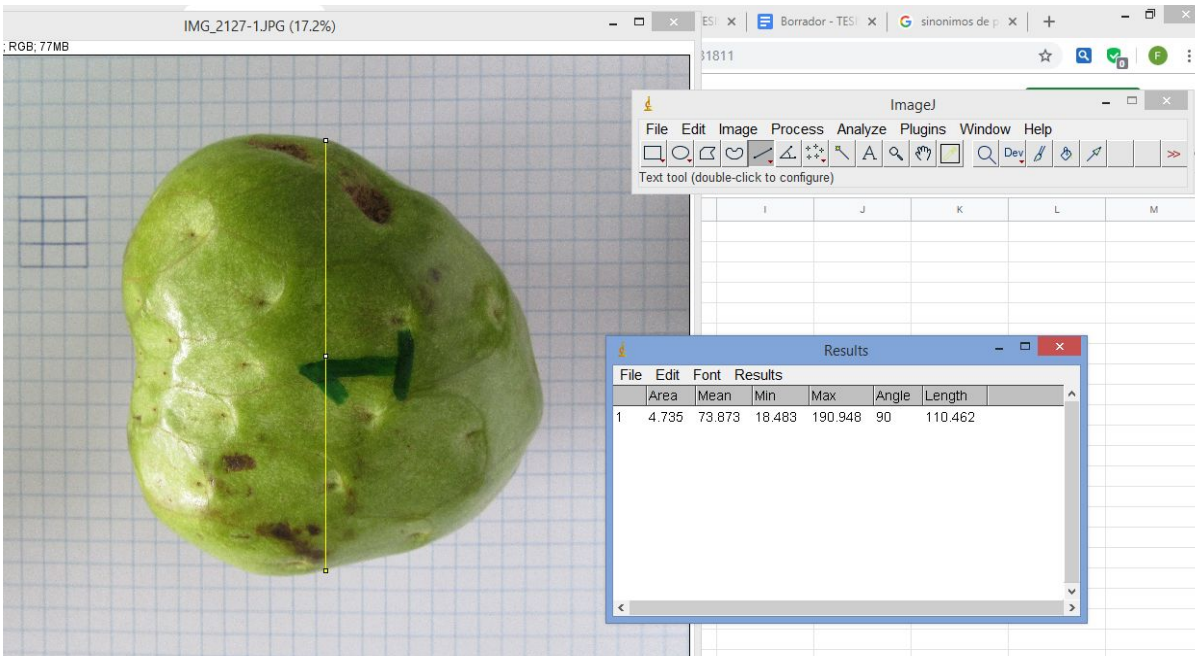


Figura 68. Obtención del diámetro en la fruta de chirimoya.

- **Volumen.**

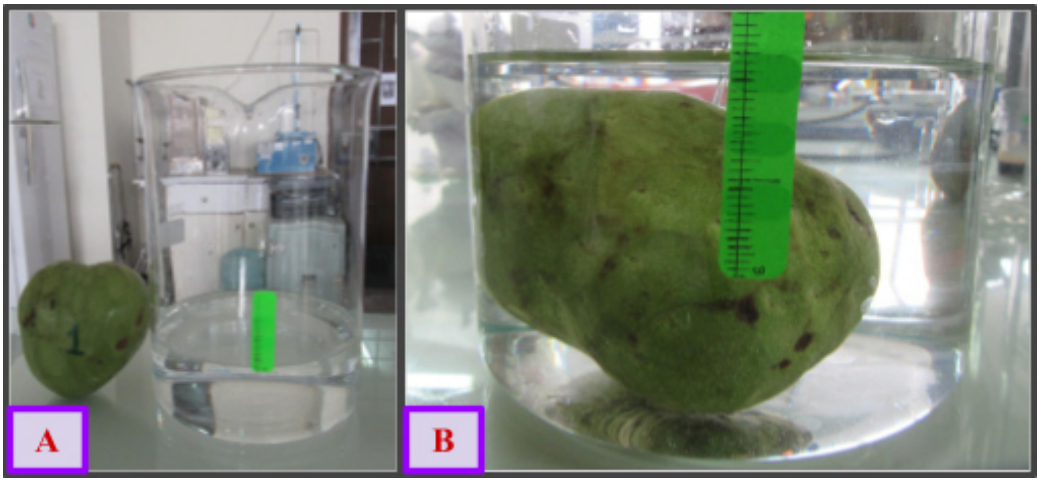


Figura 69. Obtención del volumen para el fruto de chirimoya.

A) Sistema empleado para obtener los volúmenes de chirimoya.
B) Medida de la cantidad de agua desplazada por cada fruto de chirimoya.

Anexo 26. Resultados de la caracterización física realizada a la chirimoya (variedad Lisa).

Tabla 50

Resultados de la caracterización física realizada a la chirimoya (variedad Lisa)

Repeticiones	Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Volumen (ml)
Lisa 1	252,70	10,32	11,05	268
Lisa 2	289,76	9,06	12,79	250
Lisa 3	298,04	9,67	12,65	300
Lisa 4	272,04	10,79	11,34	298
Lisa 5	326,16	9,72	11,39	360
Promedio	287,74	9,91	11,84	295,2
Desviación estándar	27,66	6,66	8,15	41,87
Coeficiente de variación	9,6132	6,7187	6,8828	14,1840

Anexo 27. Determinación del contenido de humedad en el fruto de chirimoya.

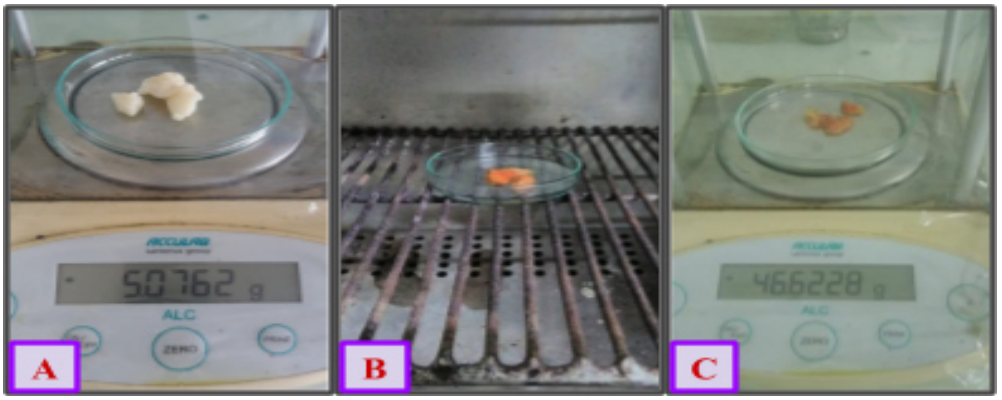


Figura 70. Determinación del porcentaje de humedad de la chirimoya.

A) Peso inicial exacto de la muestra de chirimoya húmeda.
B) Muestra de chirimoya llevado a estufa (70° C durante 48 h).
C) Peso final exacto de la muestra de chirimoya seca.

- **Cálculo del porcentaje de humedad:**

$$\%\ \text{Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100\%$$

Donde:

Peso de muestra húmeda: Peso de la muestra de chirimoya (g)

Peso de muestra seca: Peso de la muestra de chirimoya seca (g)

Datos:

Peso de la placa petri: 45,2828 g
Peso de la muestra húmeda: 5,0762 g
Peso de la muestra seca: 1,3400 g

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{5{,}0762 \text{ g} - 1{,}3400 \text{ g}}{5{,}0762 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Humedad} = 73{,}6 \ \%$$

Anexo 28. Determinación del contenido de cenizas en el fruto de chirimoya.

Figura 71. Determinación del porcentaje de cenizas de la chirimoya.

A) Peso exacto del crisol.
B) Peso exacto de la muestra seca de quitosano.
C) Muestras llevadas a mufla durante 5 h a 500° C .
D) Peso exacto de la muestra de cenizas de chirimoya más el peso del crisol.

- **Cálculo del porcentaje de cenizas:**

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso del crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100\%$$

Datos:

Peso del crisol: 14,1997 g.
Peso de la muestra seca: 1,5082 g.
Peso del crisol + cenizas: 14,2110 g.

Cálculo:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{14{,}2110 \text{ g} - 14{,}1997 \text{ g}}{1{,}5082 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Cenizas} = 0{,}75\%$$

Anexo 29. Resultados del contenido de fibra, proteínas y grasas en el fruto de chirimoya.

Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C.

JR. ALMIRANTE GUISSE N° 2580 - 2586 / LIMA 14 - PERÚ TELÉFONO: 206-9280
E-mail: satperu@satperu.com / Página web: www.satperu.com

INFORME DE ENSAYO N° DT-06180-01-2019

PRODUCTO	:	Pulpa de chirimoya congelada
SOLICITADO POR	:	Villa Encarnación Yanina Katty
DIRECCIÓN	:	Av. José Carlos Mariategui 2575. El Agustino - Lima
FECHA DE RECEPCIÓN	:	2019-10-28
FECHA DE ANÁLISIS	:	2019-10-29
FECHA DE INFORME	:	2019-11-04
SOLICITUD N°	:	SDT-13158-2019

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	:	Ninguna
ESTADO / CONDICIÓN	:	Producto en pulpa sin pepas / Congelado
PRESENTACIÓN	:	Bolsa de polietileno transparente y sellada, sin etiqueta
CANTIDAD DE MUESTRA	:	400 gramos
CANTIDAD DE MUESTRA DIRIMENTE	:	Ninguna (A solicitud del cliente)

Servicio	Vía / Resultado
(*) Fibra cruda (g/100g)	1,08
(*) Grasa (g/100g)	0,28
(*) Proteína ((Nx6,25) g/100g)	1,60

(*) LOS METODOS INDICADOS NO HAN SIDO ACREDITADOS POR INACAL-DA

MÉTODOS

(*) Fibra cruda	:	AOAC 962.09 (2016) Cap. 4, Ed. XVIII, Pág. 44. Fiber (crude) in Animal Feed and Pet Food
(*) Grasa	:	AOAC 930.09. 20th. Ed. (2016). Ether extract of plants
(*) Proteína	:	AOAC 920.152. 21st. Ed. (2019). Protein in fruit products. Kjeldahl Method

Notas

Temperatura de recepción de la muestra: -6.2°C
Contacto: Yanina Katty Villa Encarnación - Correo : yanina.villa@unmsm.edu.pe

- Informe de ensayo emitido en base a resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Válido únicamente para la muestra proporcionada. Queda absolutamente prohibida toda reproduccion parcial del presente informe sin la autorizacion escrita de SAT S.A.C. Este documento es válido solo en original.

QUIM. CLOTILDE HUAPAYA HERRERA
JEFE DIVISIÓN TÉCNICA
C.Q.P.N° 296

SOCIEDAD DE ASESORAMIENTO TÉCNICO S.A.C. SAT DIVISIÓN TÉCNICA

Figura 72. Informe del resultado de grasas, fibra cruda y proteínas en la pulpa de chirimoya.

Anexo 30. Cálculo del contenido de carbohidratos en el fruto de chirimoya.

Mediante la diferencia del 100 % con la suma de proteína, grasa, ceniza , fibra cruda y humedad se calculó el porcentaje de carbohidratos presente en la pulpa de chirimoya.

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (\%\text{Cenizas} + \%\text{Proteínas} + \%\text{Humedad} + \%\text{Grasa} + \%\text{Fibra})$$

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100\% - (0{,}8\% + 1{,}6\% + 73{,}6\% + 0{,}3\% + 1{,}1\%)$$

$$\% \text{ Carbohidratos} = 22{,}6\%$$

Anexo 31. Resultado del análisis microbiológico de la pulpa de chirimoya.

Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C.

JR. ALMIRANTE GUISSE Nº 2580 LIMA - LIMA - LINCE - TELEFONO: 206-9280
E-mail: satperu@satperu.com ; divisionteonica@satperu.com web: www.satperu.com

LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACION INACAL - DA CON REGISTRO Nº LE-009

INACAL DA-Perú Laboratorio de Ensayo Acreditado
Registro Nº LE-009

INFORME DE ENSAYO Nº DT-07192-01-2019

PRODUCTO	:	Pulpa de chirimoya congelada
SOLICITADO POR	:	Villa Encarnación Yanina Katty
DIRECCIÓN	:	Av. José Carlos Mariategui 2575 El Agustino - Lima
FECHA DE RECEPCIÓN	:	2019-12-20
FECHA DE ANÁLISIS	:	2019-12-20
FECHA DE INFORME	:	2019-12-24
SOLICITUD Nº	:	SDT-15022-2019

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	:	Ninguna
ESTADO / CONDICIÓN	:	Producto en pulpa / Congelado
PRESENTACIÓN	:	Bolsa de polietileno transparente sellada sin litografiar, sin etiqueta.
CANTIDAD DE MUESTRA	:	400 gramos
CANTIDAD DE MUESTRA DIRIMENTE	:	Ninguna (A solicitud del cliente)

Servicio	Vía / Resultado
Aerobios Mesófilos o Recuento Aerobico En Placa (ufc/g Est)	<25x10
E. coli Numeración (NMP/g)	<3.0
Listeria Monocytogenes Deteccion (/25g)	Ausencia
Salmonella Detección (/25g)	Ausencia

MÉTODOS

Aerobios Mesófilos o Recuento Aerobico En Placa	:	FDA/BAM (1995) 8th Edition, (Revision A, 1998). Chapter 3. Revisado January 2001. Aerobic Plate Count Conventional Plate Count Method
E. coli Numeración	:	FDA/BAM 1995, 8th Edition (Rev. A, 1998. Chapter 4. Revisado Julio 2017, Item I (Excepto H). Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Conventional Method for Determining Coliforms and E. coli
Listeria Monocytogenes Deteccion	:	FDA/BAM (1995) 8th Ed., Rev. A, 1998. Chapter 10, Rev. March 2017. Excepto Item D.1.c, D.2, F, H.2, L.J. Detection and Enumeration of Listeria Monocytogenes. Detection of Listeria Monocytogenes in Foods and Environmental samples and Enumeration of Listeria Monocytogenes in Foods.
Salmonella Detección	:	FDA/BAM 8th Ed., Rev. A, 1998. Chapter 5. Revisado Julio 2018. excepto Items E4, E6b, E9, E10 y E11. Salmonella.

Notas

Contacto: Yanina Katty Villa Encarnación - Correo: yanina.villa@unmsm.edu.pe
Temperatura de recepcion de la muestra : -6.5°C

- Informe de ensayo emitido en base a resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Válido únicamente para la muestra proporcionada. No debe ser utilizado como Certificado de Conformidad. Queda absolutamente prohibida toda reproducción parcial del presente informe sin la autorización escrita de SAT. Este documento es válido solo en original.

QUIM. CLOTILDE HUAPAYA HERRERA
JEFE DIVISIÓN TÉCNICA
C.Q.P.Nº 296

SOCIEDAD DE ASESORAMIENTO TÉCNICO S.A.C. SAT DIVISIÓN TÉCNICA

Figura 73. Informe del resultado de la evaluación microbiológica en la pulpa de chirimoya.

Anexo 32. Resultados del índice de madurez en la selección de la variedad.

Tabla 51

Resultados del índice de madurez en la selección de la variedad

Variedad	Repeticiones	Índice de madurez (°Brix/acidez)
Lisa	R1	68,28
	R2	66,67
	R3	65,16
	R4	66,21
	Promedio	**66,58**
Impresa	R1	64,44
	R2	65,93
	R3	63,57
	R4	63,57
	Promedio	**64,38**
Umbonata	R1	62,50
	R2	65,33
	R3	60,61
	R4	66,00
	Promedio	**63,61**

Resultados

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Índice de Madurez	12	0.41	0.28	2.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19.01	2	9.51	3.09	0.0950
Variedad	19.01	2	9.51	3.09	0.0950
Error	27.67	9	3.07		
Total	46.69	11			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.46180

Error: 3.0747 gl: 9

Variedad	Medias	n	E.E.	
Lisa	66.58	4	0.88	A
Impresa	64.38	4	0.88	A
Umbonata	63.61	4	0.88	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 74. Cuadro Anova y comparación de Tukey del índice de madurez en la selección de la variedad.